



Daniel Popielarz Guerreiro

Licenciado em Bioquímica

Caracterização funcional do neutrófilo na esteato-hepatite alcoólica e não alcoólica

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Ângelo Calado, Professor Auxiliar, Faculdade
Medicina Universidade de Lisboa

Co-orientador: Margarida Castro Caldas, Professor Auxiliar,
Faculdade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Doutora Maria Godinho Alves Vieira Duarte Soares

Vogal: Prof. Doutor Ângelo Miguel Silva Calado



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro 2012

LOMBADA



**Caracterização funcional do neutrófilo na esteato-hepatite alcoólica e não
alcoólica**

2012



Daniel Popielarz Guerreiro

Licenciado em Bioquímica

Caracterização funcional do neutrófilo na esteato-hepatite alcoólica e não alcoólica

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Ângelo Calado, Professor Auxiliar, Faculdade
Medicina Universidade de Lisboa

Co-orientador: Margarida Castro Caldas, Professor Auxiliar,
Faculdade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Doutora Maria Godinho Alves Vieira Duarte Soares

Vogal: Prof. Doutor Ângelo Miguel Silva Calado



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

!!!

Dezembro 2012

Caracterização funcional do neutrófilo na esteato-hepatite alcoólica e não alcoólica

Copyright Daniel Popielarz Guerreiro, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Ângelo Calado pela oportunidade que me deu em realizar este trabalho, pelo acompanhamento e orientação durante o decorrer do mesmo, e pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

Dedico esta tese aos meus pais pelo esforço e apoio dado durante o meu percurso académico.

Resumo

As esteato-hepatites alcoólica (ASH) e não alcoólica (NASH) são doenças inflamatórias que apesar das diferenças etiológicas, apresentam um padrão de evolução clínica e características morfológicas semelhantes. Entre estas salientam-se a deposição de gordura em hepatócitos e um infiltrado hepático de células inflamatórias, entre as quais se destacam os neutrófilos. Para doentes com cirrose sobreposta a ASH, tem sido descrita uma disfunção destes leucócitos na circulação sanguínea. Neste respeito, o presente trabalho teve como objectivo investigar se semelhante disfunção neutrofílica seria também observada na NASH.

Por citometria de fluxo, procedeu-se a uma caracterização funcional de neutrófilos de sangue periférico de três grupos experimentais: (i) grupo controlo de indivíduos saudáveis; (ii) doentes com cirrose alcoólica compensada e (iii) doentes com NASH. Este estudo incluiu a análise da capacidade fagocítica, da explosão oxidativa e da expressão de marcadores de activação (CD66b, CD62L e CD11b).

Em relação à fagocitose, explosão oxidativa e expressão de CD66b, não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos. Quanto à expressão membranar de CD62L e de CD11b, doentes com cirrose alcoólica compensada não apresentaram diferenças com significância estatística face ao grupo controlo. Por oposição, observaram-se diminuições significativas ($p < 0,05$) na expressão destes dois marcadores em doentes com NASH face a controlos saudáveis. A diminuição da expressão de CD62L poderá correlacionar-se com um estado de pré-activação dos neutrófilos em circulação em doentes com NASH, pese embora os restantes parâmetros funcionais não o sugiram. Por outro lado, a diminuição da expressão membranar de CD11b nestes doentes afigura-se como um resultado que embora de difícil interpretação, se poderá constituir como uma pista relevante para o estudo do papel do neutrófilo na NASH.

De salientar porém, o carácter preliminar destas conclusões dada a reduzida amostragem de doentes analisados. A inclusão de mais pacientes será certamente relevante para um estudo mais conclusivo.

Palavras-chave: Neutrófilo; Cirrose; Esteato-hepatite alcoólica; Esteato-hepatite não alcoólica

Abstract

Alcoholic Steatohepatitis (ASH) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) are inflammatory diseases that despite etiologic differences, share a similar pattern of clinical progression and similar morphological features. Among these are the deposition of fat on hepatocytes and the hepatic infiltration of inflammatory cells, like the neutrophils. Importantly, blood circulating neutrophils from patients with ASH superimposed on cirrhosis patients have been demonstrated to be dysfunctional. In this respect, the present work aimed to investigate whether a similar neutrophilic dysfunction could be detected in NASH.

By using flow cytometry, we evaluated the function of peripheral blood neutrophils in three experimental groups: (i) a control group of healthy individuals; (ii) patients with compensated alcoholic cirrhosis and (iii) NASH patients. In this study, we examined neutrophil phagocytosis, oxidative burst, and the expression of activation markers (CD62L, CD66b, CD11b).

In relation to phagocytosis, oxidative burst and membrane expression of CD66b, no significant differences were observed among the experimental groups. Additionally, the expression of CD62L and CD11b was not significantly altered in neutrophils from cirrhotic patients when compared to control ones. In clear contrast, neutrophils from NASH patients showed a significantly lower expression ($p < 0,05$) of CD62L and CD11b than in controls. This decreased CD62L expression suggests that NASH neutrophils may be already primed in the blood circulation, what was nevertheless not corroborated by the other parameters assayed in this study. Although difficult to explain, the decrease in membrane expression of CD11b expression may constitute an important cue for the study of the role of the neutrophil in NASH.

In view of the reduced number of patients included in this study, it is however important to bear in mind that these are still preliminary conclusions. The inclusion of further patients will be of utmost importance for a more conclusive study.

Kew yords: Neutrophil; Cirrhosis; Alcoholic Steatohepatitis; Nonalcoholic Steatohepatitis

Índice

Resumo.....	I
Abstract.....	III
Índice	V
Índice de figuras	VII
Índice de tabelas.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1 O Fígado	1
1.2 Doenças hepáticas alcoólicas e Doenças hepáticas não alcoólicas.....	2
1.3 Esteatose	4
1.3.1 ASH.....	5
1.3.2 NASH	6
1.3.3 Fibrose.....	7
1.3.4 Tratamento da ASH e da NASH.....	7
1.4 Resposta Inflamatória	8
1.4.1 Neutrófilos	9
1.4.2 Neutrófilos na Resposta Inflamatória	10
1.4.3 Actividade antimicrobiana.....	12
1.4.4 Neutrófilos nas esteato-hepatites alcoólicas e não alcoólicas.....	14
1.5 Objectivo.....	15
2. Materiais e Métodos	17
2.1 Lista de Material.....	17
2.2 Lista de anticorpos.....	17
2.3 Lista Reagentes.....	18
2.4 Métodos	18
2.4.1 Colheita de amostras de sangue	18
2.4.2 Citometria de Fluxo	19
2.4.3 Fluorocromos.....	21
2.4.4 Análise de dados	22
2.4.5 Avaliação funcional dos neutrófilos	23

2.4.5.1	Fagocitose.....	23
2.4.5.1.1	Metodologia.....	23
2.4.5.1.2	Procedimento Experimental.....	23
2.4.5.1.3	Aquisição e análise em citometria de fluxo.....	24
2.4.5.2	Explosão Oxidativa.....	25
2.5.5.2.1	Metodologia.....	25
2.5.1.2.2	Procedimento Experimental.....	26
2.5.1.2.3	Aquisição e análise em citometria de fluxo.....	26
2.4.5.3	Expressão de marcadores de superfície de neutrófilos.....	27
2.5.5.3.1	Metodologia.....	27
2.5.1.3.2	Procedimento Experimental.....	27
2.5.1.3.3	Aquisição e análise em citometria de fluxo.....	28
2.5	Tratamento de resultado e análise estatística	28
3.	Resultados	29
3.1	Características dos pacientes.....	29
3.2	Fagocitose	29
3.3	Explosão Oxidativa	31
3.3.1	Condição Basal	31
3.3.2	Estimulação com fMLP.....	33
3.3.3	Estimulação com PMA.....	34
3.3.4	Apresentação global de resultados de explosão oxidativa.....	36
3.4	Expressão de marcadores de superfície de neutrófilos.....	36
3.4.1	Marcação CD66b/CD62L	37
3.4.2	Marcação CD11b /CD11b act.....	40
4.	Discussão	45
4.1	Discussão Geral.....	45
4.2	Conclusões	49
5.	Bibliografia.....	51

Índice de figuras

Figura 1.1- Representação esquemática do quadro de progressão da ALD e da NAFLD.....	2
Figura 1.2- Metabolismos hepático de TG.....	4
Figura 1.3- Cascata de adesão de neutrófilos	11
Figura 1.4- Actividade antimicrobiana dos neutrófilos.....	12
Figura 2.1- Esquema geral de um citómetro de fluxo	19
Figura 2.2- Propriedades de dispersão de luz por uma célula	20
Figura 2.3- Ligação específica de um anticorpo conjugado com um fluorocromo a um antígeno celular.....	21
Figura 2.4- Gráfico SSC vs FSC.....	22
Figura 3.1- Avaliação da capacidade fagocítica de neutrófilos por citometria de fluxo	30
Figura 3.2- Capacidade fagocítica de neutrófilos nos diferentes grupos experimentais	30
Figura 3.3- Análise por citometria de fluxo da explosão oxidativa basal de neutrófilos	32
Figura 3.4 – Produção basal de ROS em neutrófilos não estimulados	32
Figura 3.5- Análise por citometria de fluxo da explosão oxidativa de neutrófilos mediante estimulação com fMLP.....	33
Figura 3.6- Produção de ROS em neutrófilos estimulados com fMLP.....	34
Figura 3.7- Análise por citometria de fluxo da explosão oxidativa de neutrófilos mediante estimulação com PMA	35
Figura 3.8- Produção de ROS em neutrófilos estimulados com PMA.....	35
Figura 3.9- Produção de ROS em neutrófilos nas diferentes condições experimentais.	36
Figura 3.10- Expressão dos marcadores CD66b e CD62L em neutrófilos.....	37
Figura 3.11- Percentagem de neutrófilos CD62L+/CD66B+.....	38
Figura 3.12- Expressão de CD66b em neutrófilos dos diferentes grupos experimentais	39
Figura 3.13- Expressão de CD62L em neutrófilos dos diferentes grupos experimentais	39
Figura 3.14- Expressão de CD11b total e activado em neutrófilos	49
Figura 3.15- Percentagem de neutrófilos CD11b+/CD11b act+.....	41
Figura 3.16- Expressão de CD11b total em neutrófilos dos diferentes grupos experimentais	42
Figura 3.17- Expressão de CD11b activado em neutrófilos dos diferentes grupos experimentais ...	42
Figura 3.18. Razão CD11b activado/CD11b total	43

Índice de tabelas

Tabela 2.1- Volumes de HBSS e de anticorpos adicionados para marcação das amostras	28
---	-----------

1. Introdução

1.1 O Fígado

O fígado é o maior órgão interno do corpo humano e desempenha funções essenciais à vida (Maher, 1997; Seki e Schnabl, 2011). Pela artéria hepática recebe sangue rico em oxigénio e, através da veia porta, recebe sangue que transporta nutrientes e outras substâncias absorvidas a nível do intestino delgado. Devido a esta única forma de fornecimento sanguíneo, o fígado é particularmente vulnerável à exposição por produtos bacterianos que passem o epitélio intestinal (Seki e Schnabl, 2011). Estruturalmente, divide-se em unidades funcionais, os lóbulos (Maher, 1997), que consistem em vasos sanguíneos rodeados por hepatócitos, células de Kupffer, células-hepáticas estreladas (HSC, do inglês *Hepatic Stellate cells*) e células endoteliais (Nunes e Moreira, 2006).

Os hepatócitos são as células mais abundantes no fígado e são responsáveis por diversas funções biológicas: (i) remover e destruir substâncias tóxicas da circulação sanguínea; (ii) produzir e secretar bÍlis para o intestino delgado, facilitando a digestão de gorduras; (iii) remover e utilizar parte dos nutrientes absorvidos no intestino delgado promovendo a síntese de colesterol, o armazenamento e metabolização de açúcares, a síntese proteica e o processamento de gorduras (Maher, 1997); (iv) sintetizar a maior parte das proteínas plasmáticas, entre as quais os factores de coagulação, sendo pois responsáveis pelo mecanismo de coagulação sanguínea (Nunes e Moreira, 2006).

O fígado desempenha ainda um importante papel importante na resposta imune inata através da acção das células de Kupffer. Estas células constituem macrófagos residentes no tecido hepático que, aproveitando a sua localização estratégica entre a veia porta e a circulação sistémica (Valenti e Fracanzani, 2009) são responsáveis pela fagocitose de bactérias, produtos bacterianos e parasitas que possam ter sido absorvidos a nível do intestino delgado (Leber *et al* 2009; Nunes e Moreira, 2006).

Por outro lado, o fígado constitui o único órgão interno com capacidade de regeneração desempenhando as HSC um papel fundamental no processo. No entanto, devido á importância das funções desempenhadas, qualquer lesão que persista de forma continuada pode afectar significativamente o normal funcionamento do fígado (Seki e Schnabl, 2011).

1.2 Doenças hepáticas alcoólicas e Doenças hepáticas não alcoólicas

As doenças hepáticas de origem alcoólica (ALD, do inglês *Alcoholic Liver Disease*) e não alcoólica (NAFLD, do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) encontram-se entre as causas mais comuns da patologia hepática (Valenti e Fracanzani, 2009). Estão respectivamente relacionadas com o consumo de álcool e com o síndrome metabólico e caracterizam-se por uma deposição excessiva de gordura em hepatócitos (Bataller *et al*, 2011). Apesar de serem condições patológicas distintas, partilham um quadro de progressão clínico que engloba sequencialmente um conjunto de condições, que se apresentam na figura 1.1: a simples esteatose (acumulação de gordura nos hepatócitos), esteato-hepatite (esteatose coexistente com inflamação e lesão hepática) e cirrose (falha hepática devido ao progressivo processo fibrótico) que pode progredir para carcinoma. (Labor *et al*, 2007; Valenti e Fracanzani, 2009).

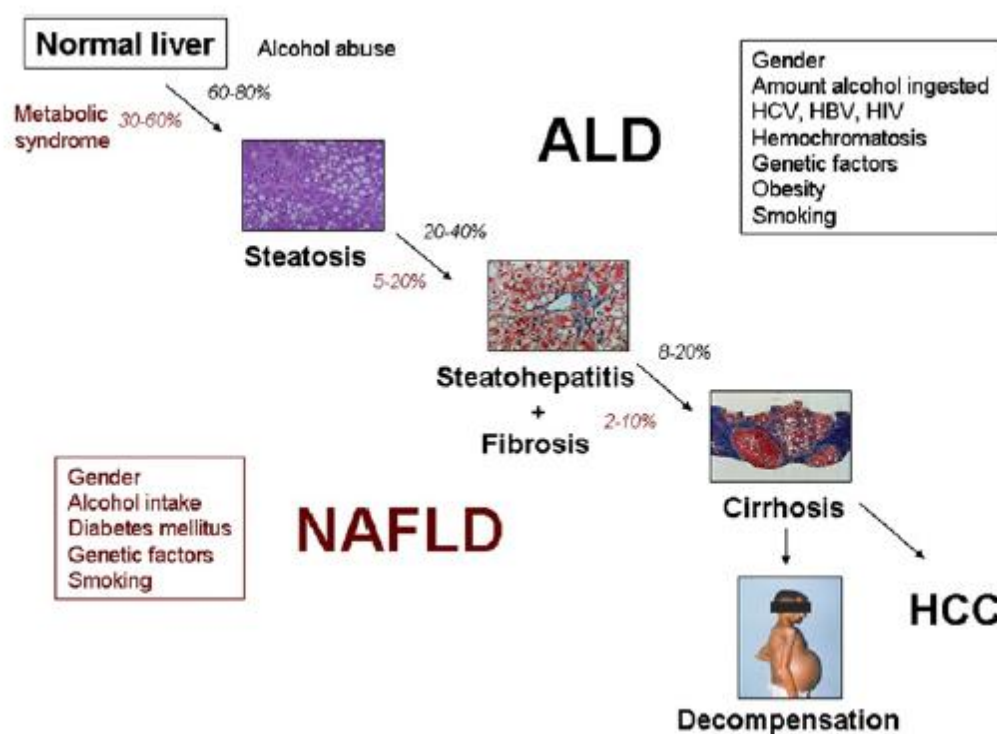


Figura 1.1- Representação esquemática do quadro de progressão da ALD e da NAFLD (Bataller, 2011). A ALD e a NAFLD partilham etapas durante o seu desenvolvimento, iniciam-se sempre com o desenvolvimento de uma esteatose que, devido a diversos factores, pode agravar-se.

A esteatose, por si só, é considerada benigna e reversível (Sakaguchi *et al*, 2011). Porém, caso as causas da acumulação de gordura nos hepatócitos persistam, podem-se desencadear processos inflamatórios com a consequente evolução para esteato-hepatite (Reddy e Rao, 2005).

A esteato-hepatite alcoólica (ASH, do inglês *Alcoholic SteatoHepatitis*) e a esteato-hepatite não alcoólica (NASH, do inglês *Non Alcoholic SteatoHepatitis*) são respectivamente etapas do desenvolvimento da ALD e da NAFLD (Tannapfel *et al*, 2011; Bataller *et al*, 2011). Do ponto de vista histológico, a ASH e a NASH partilham diversas características nas quais se incluem: a esteatose, *balloning* e apoptose de hepatócitos, infiltração e acumulação de células inflamatórias e fibrose (Yeh e Brunt, 2007; Bataller *et al*, 2011). O seu estudo é de particular relevância porque, tanto a ASH como a NASH podem comprometer a função hepática, devido ao facto de constituírem condições intermédias para o desenvolvimento de cirrose (Sakaguchi *et al*, 2011).

A ASH está relacionada com o consumo de álcool, a principal causa para doenças hepáticas em países ocidentais (Bruha *et al*, 2012). O consumo excessivo de bebidas alcoólicas altera o normal funcionamento dos mecanismos de metabolização do álcool predispondo para falha hepática (Bruha *et al*, 2012; Labor *et al*, 2007).

Por seu turno a NASH foi proposta para descrever aspectos histopatológicos típicos de ALD em pacientes que não apresentavam um consumo significativo de álcool (Marra *et al*, 2007; AGA, 2002). É considerada a manifestação hepática do síndrome metabólico (Marra *et al*, 2007) e está associada a condições como obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (Labor *et al*, 2007).

À semelhança de outros tipos de doenças hepáticas, a maioria dos pacientes diagnosticados com ASH e NASH são assintomáticos. As alterações hepáticas só são detectadas através de exames laboratoriais de rotina que revelem níveis serológicos elevados de enzimas hepáticas como a Alanina Transaminase e a Aspartato Transaminase (AGA,2002; EASL, 2012). O diagnóstico clínico baseia-se num quadro histológico de esteato-hepatite na ausência de hepatite viral em conjugação com: (i) consumo de álcool inferior a 20g/dia para a NASH (AGA, 2002); (ii) a confirmação de abuso ou dependência de álcool para a ASH (EASL, 2012). A confirmação histológica só é possível com recurso a uma biopsia ao fígado, um processo invasivo não indicado a todos os pacientes (AGA,2002; EASL, 2012).

As semelhanças histopatológicas partilhadas pela ASH e a NASH estendem-se também ao modelo proposto para o seu desenvolvimento: a teoria dos dois estímulos (em inglês: *two hit-theory*). De acordo com esta teoria, ambas se desenvolvem pelo aparecimento no fígado de dois estímulos sequenciais. Em ambas, a esteatose deverá funcionar como o estímulo inicial, predispondo o fígado a induzir uma resposta inflamatória devido à acção subsequente de um segundo ou de múltiplos estímulos tais como: o stress oxidativo, os níveis de endotoxina na circulação sanguínea e acção de citocinas (Labor *et al* 2007; Reddy e Rao, 2005).

1.3 Esteatose

A esteatose é um pré-requisito e a fase inicial do desenvolvimento tanto da ASH como da NASH, sendo diagnosticada mediante a observação de uma deposição de gordura em 5 a 10% dos hepatócitos (Marra *et al*, 2007). Quando mais de 50% dos hepatócitos apresentam deposição de gordura, a patologia toma o nome doença de fígado gordo (Tannapfel *et al*, 2011). Os mecanismos exactos que levam à esteatose não se encontram esclarecidos, embora se saiba que as lesões hepáticas subsequentemente observadas tanto na ASH como na NASH, resultem da acumulação excessiva de ácidos gordos na forma de Triglicéridos (TG) em hepatócitos (Labor *et al*, 2007).

O fígado desempenha um papel chave no metabolismo lipídico (Guturu e Duchini 2012). Os ácidos gordos presentes no fígado podem ser provenientes da dieta, do tecido adiposo ou ser sintetizados internamente (Cohen *et al*, 2011). Por outro lado, podem ter diferentes destinos metabólicos: podem ser oxidados nas mitocôndrias para produção de energia, reesterificados em TG e armazenados em vacúolos ou, acoplados a apoproteína B100 para serem exportados na forma de *Very-Low-Density Lipoprotein* (VLDL) (Cohen *et al*, 2011; Guturu e Duchini, 2012). Na figura 1.2 identificam-se as vias de entrada de e de metabolização de ácidos gordos no fígado.

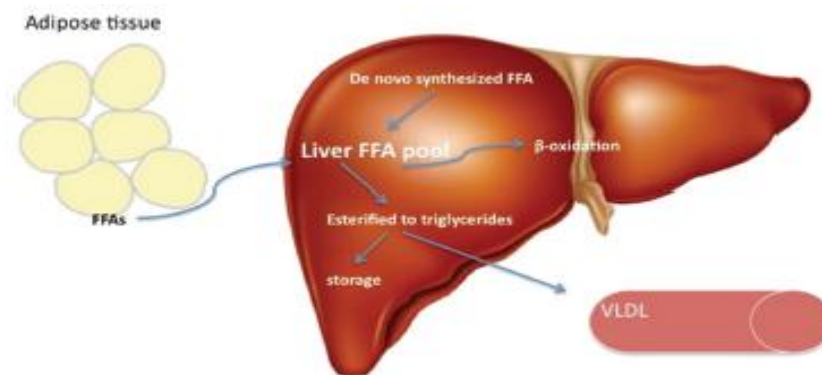


Figura 1.2- Metabolismos hepático de TG (Guturu, 2012). Os ácidos gordos livres presentes no fígado são provenientes da síntese interna ou capturados da circulação. São depois oxidados ou esterificados em TG para reserva, ou libertados na forma de VLDL.

A esteatose hepática resulta de um desequilíbrio entre a síntese, a metabolização e a remoção de TG nos hepatócitos (Cohen *et al*, 2011; Guturu e Duchini, 2012), o qual pode ser originado por factores distintos dependendo da doença hepática em questão.

1.3.1 ASH

A ASH desenvolve-se em indivíduos com um consumo crónico de álcool diário ao longo de anos (Stickel e Seitz, 2010). Regra geral, um consumo de álcool entre 40-80g/dia em homens e 20-40g/dia em mulheres durante 10-12 anos conduz certamente ao desenvolvimento de complicações hepáticas (Gramenzi *et al*, 2006).

A maior parte do álcool consumido é metabolizada no fígado por acção de mecanismos que envolvem a enzima Álcool Desidrogenase (ADH), o citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e a catalase mitocondrial (Gramenzi *et al*, 2006; Bruha *et al*, 2012; Donohue, 2007). As vias da ADH e do CYP2E1 são as mais associadas à progressão da ASH (Bruha *et al*, 2012).

A via da ADH é utilizada pelo fígado para degradar pequenas quantidades de álcool. Um aumento nos níveis de álcool que chegam ao fígado satura esta via, levando a uma redução excessiva de NAD⁺, uma coenzima desta via metabólica (Gramenzi *et al*, 2006; Bruha *et al*, 2012; Donohue, 2007). O álcool promove indirectamente a esteatose porque níveis elevados desta coenzima desregulam os metabolismos lipídicos devido à inibição da β -oxidação de ácidos gordos e a um aumento da síntese de novo dos mesmos (Stickel e Seitz, 2010). A via metabólica do CYP2E1 é activada quando os níveis de exposição a álcool são mais elevados (Gramenzi *et al*, 2006; Bruha *et al*, 2012). Esta enzima contribui também para a progressão da ASH, devido a mecanismos relacionados com a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Gramenzi *et al*, 2006).

A patogénese da ASH está ainda associada a mecanismos imunológicos inatos medidos pela activação das células de Kupffer (Gramenzi *et al*, 2006; Valenti e Francanzani, 2009; Sakaguchi *et al*, 2011). O álcool aumenta a permeabilidade do intestino a LPS, ou endotoxina, um dos maiores constituintes da parede celular bacteriana (Leber *et al*, 2009). Em condições normais, as células de Kupffer reconhecem e metabolizam rapidamente a endotoxina através de receptores específicos (Leber *et al*, 2009). Porém, a ingestão de elevadas quantidades de álcool potencia os níveis séricos de endotoxina na veia porta, os quais induzem ao nível das células de Kupffer: (i) a activação de vias de sinalização pró-inflamatórias, como a do NF- κ B (factor de transcrição nuclear kappa B), que promovem a transcrição de genes de acção pró-inflamatória, como as citocinas TNF- α (do inglês, *Tumor necrosis factor-alpha*), IL-6, IL-8, IL-12 (Gramenzi *et al*, 2006; Valenti e Francanzani, 2009) e (ii) a produção de ROS (Valenti e Francanzani, 2009).

Tanto as ROS como as citocinas pró-inflamatórias produzidas nestas condições favorecem a progressão de esteatose para esteato-hepatite. Por um lado, a produção excessiva de ROS altera a estrutura de biomoléculas essenciais como proteínas, lípidos, e ADN, o que tem implicações funcionais em hepatócitos. Por outro, as referidas citocinas pró-inflamatórias contribuem para a amplificação da

resposta inflamatória induzida e assim conduzem entre outros efeitos, ao recrutamento e activação de granulócitos. (Valenti e Francanzani, 2009; Maher, 1997).

Como visível na figura 1.1, apenas entre 20-40% dos pacientes com esteatose alcoólica evoluem para ASH. Para esta evolução são igualmente relevantes outros factores como o género, malnutrição e polimorfismos génicos, que podem contribuir para o agravamento do quadro clínico em alguns indivíduos (Bruha *et al*, 2012; Gramenzi *et al*, 2006).

1.3.2 NASH

A NASH é uma das principais causas das anomalias bioquímicas a nível hepático registadas em países desenvolvidos devido sobretudo à alteração dos hábitos alimentares e à adopção de estilos de vida sedentários e, como tal, está relacionada com o desenvolvimento do síndrome metabólico (Anstee *et al*, 2011). A esteatose inicial é na maior parte dos casos provocada por ácidos gordos que entram em hepatócitos resultado de um aumento da lipólise no tecido adiposo, ou provenientes da dieta. (Tilg e Moschen, 2010; Marra *et al*, 2007).

Sendo a NASH uma doença de carácter multifactorial (associado ao síndrome metabólico), os mecanismos exactos que promovem a esteatose inicial não se encontram totalmente definidos, no entanto a resistência à insulina (RI) encontra-se associada à maioria dos casos clínicos (Angulo, 2002; Marra *et al*, 2007; Reddy e Rao, 2005). A insulina é uma hormona secretada pelo pâncreas em resposta a níveis elevados de glicose no sangue que normalmente ocorrem após uma refeição. A insulina actua ao nível dos músculos e do tecido adiposo de forma a normalizar os níveis de glicemia, sendo que para tal, estimula a captação e utilização do excesso de glicose em circulação (Voet, 2004). A RI é uma condição que provoca uma perda da sensibilidade celular à insulina, que se pode manifestar pela inibição ou limitação da entrada de glicose a nível destes e outros tecidos, favorecendo os ácidos gordos como principal fonte energética (Voet, 2004). A RI está relacionada com a esteatose porque: 1) interfere com os mecanismos de inibição da lipólise no tecido adiposo, o que aumenta os níveis de ácidos gordos disponíveis para entrar em hepatócitos; 2) promove a síntese de ácidos gordos e diminui a sua saída por VLDL (Angulo, 2002; Sakaguchi *et al* 2011).

A retenção de ácidos gordos nos hepatócitos é também responsável pela progressão da esteatose a esteato-hepatite devido mecanismos de stress celular (Angulo, 2002). Isto acontece porque a via mitocondrial de β -oxidação de ácidos gordos fica saturada nestas condições e, os ácidos gordos acumulados, funcionam como substrato e indutor da enzima CYP2E1 capaz de gerar ROS (Angulo, 2002; Marra *et al* 2007).

A severidade da esteatose e a progressão para esteato-hepatite tem sido também associada ao crescimento de bactérias no intestino delgado (*SIBO*, do inglês *Small Intestin Bacterial Overgrowth*)

(Miele et al, 2009). Este crescimento exagerado de bactérias leva a inflamações que conduzem a perdas da integridade intestinal (Dibaise, 2008), aumentando a permeabilidade a produtos bacterianos (Miele et al, 2009), que podem activar a resposta inflamatória (Edmison e McCullough, 2007).

À semelhança do que acontece na ASH, a anormal produção de ROS tem efeitos citotóxicos severos na NASH, já que pode precipitar a morte celular ou, activar mecanismos de resposta adaptativa como a activação de factores de transcrição NF- κ B e AP-1 (do inglês, *Activator Protein-1*) responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e das Interleucina IL-1, IL-8 e IL-12 (Marra et al, 2007; Labor et al, 2007; Valenti e Francanzani, 2009; Sakaguchi et al 2011).

A progressão de esteatose para esteato-hepatite só acontece em alguns casos (figura 1.1). Embora não se conheçam por completo as razões que o justificam, este facto pode dever-se a diferenças no índice de distribuição de gorduras no corpo, predisposição genética e alterações nos sistemas antioxidantes (Angulo, 2002).

1.3.3 Fibrose

A capacidade de regeneração do fígado deve-se à acção combinada de vários tipos celulares, entre os quais as células hepáticas estreladas. Durante um processo inflamatório crónico, estas células são activadas e diferenciam-se em células fibróticas que produzem uma matriz extracelular rica em colagénio e glicoproteínas (Lotersztajn et al, 2005). Esta matriz extracelular preenche os locais deixados vagos por hepatócitos que morreram e sustenta a proliferação do tecido fibrótico (Ramadori et al, 2008).

Como resultam de processos inflamatórios hepáticos crónicos, tanto a ASH como a NASH encontram-se associadas a uma desregulação dos normais processos de regeneração, o que pode promover assim uma substituição progressiva de parênquima hepático por tecido fibrótico (Lee e Friedman, 2011). Como consequência, a arquitectura e funcionamento do fígado são alteradas, podendo, devido à persistência do processo fibrótico desenvolver-se cirrose (Ramadori et al, 2008).

1.3.4 Tratamento da ASH e da NASH

A melhor forma de tratar a ASH e a NASH passa pela atenuação dos factores de risco respectivos. No tratamento da ASH a abstinência alcoólica é fundamental para prevenir lesões mais graves, pois beneficia claramente o quadro histológico de doentes em qualquer fase da doença (Marsano et al, 2003; Day, 2007). No caso da NASH, o tratamento envolve a identificação e resolução das condições metabólicas associadas. A perda de peso, a melhoria dos hábitos alimentares e a prática regular de exercício físico, são estratégias que melhoram os quadros de obesidade e de resistência à insulina (Adams e Angulo, 2006).

Dado o carácter inflamatório e de stress celular das duas patologias, o uso de corticoesteróides e de antioxidantes tem sido estudado (Day, 2007; Valenti e Francanzani, 2009), no entanto ainda não existe uma terapêutica farmacológica aprovada. (Marsano *et al*, 2003).

Apesar da ASH e da NASH corresponderem a patologias distintas, uma não exclui a outra, um indivíduo pode sofrer das duas patologias se sobre si coincidirem os factores de risco e os distúrbios metabólicos associados. A profilaxia é o comportamento a seguir para evitar o desenvolvimento destas complicações hepáticas.

1.4 Resposta Inflamatória

A resposta inflamatória é uma importante barreira defensiva do sistema imune inato. É inespecífica e ocorre em tecidos vascularizados em resposta a infecções e lesões (Srikrishna e Freeze, 2009; Goldsby *et al*, 2003). A resposta inflamatória pode ser aguda ou crónica.

A resposta inflamatória aguda é um processo de curta duração que envolve processos vasculares, caracterizados pela vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos na região afectada, o que permite a formação de um exsudado rico em proteínas e células, causando um edema (Goldsby *et al*, 2003). Engloba ainda a ocorrência de eventos celulares, caracterizados pelo recrutamento localizado de células fagocitárias que circulam na corrente sanguínea como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos e, da activação das células inflamatórias residentes nos tecidos como macrófagos e mastócitos (Goldsby *et al*, 2003).

O desenrolar da resposta inflamatória aguda envolve diversos mediadores químicos, mas inicia-se com o reconhecimento do agente infeccioso. As células da imunidade inata têm a capacidade de identificar microrganismos através do reconhecimento de moléculas altamente conservadas em agente inflamatórios, as PAMP (do inglês, *Pathogen-associated Molecular Pattern*) (Dempsey *et al*, 2003; Kumar *et al*, 2011). Por outro lado, stress celular, lesões nos tecidos e células necróticas levam à libertação de moléculas endógenas associadas a lesões, as DAMP (do inglês, *Damage Associated Molecular Pattern Molecules*), ou alarminas (Srikrishna e Freeze, 2009). As PAMP e as DAMP são reconhecidas especificamente por células envolvidas na imunidade inata através de receptores específicos, os PRRs (do inglês, *Pathogen-recognition Receptors*) (Goldsby *et al*, 2003; Dempsey *et al*, 2003; Kumar *et al*, 2011). Os PRRs podem ser intra e extracelulares ou estar presentes na membrana celular e, quando contactam com as PAMP ou DAMP, promovem alterações genéticas que resultam no aumento da expressão de citocinas e quimiocinas (Dempsey *et al*, 2003; Kumar *et al*, 2011; Goldsby *et al*, 2003), o que favorece o processo inflamatório pelo recrutamento de leucócitos (Goldsby *et al*, 2003). Dos PRRs, os TLR são a classe mais estudada, sendo por exemplo expressos por monócitos, neutrófilos e macrófagos

dos tecidos (Tosi, 2005). O processo inflamatório perdura até que o agente que o despertou seja eliminado (Ramadori et al, 2008).

Caso a inflamação aguda não seja interrompida, os seus componentes podem causar danos e lesões nos tecidos envolvidos (Stauffer *et al*, 2012). Neste caso, desenvolve-se um processo inflamatório crónico de longa duração, caracterizado por um infiltrado celular que coexiste com a tentativa de recuperação dos tecidos (Wakefield e Kumar, 2001). A ASH e a NASH são exemplos de patologias associadas a inflamações crónicas. De facto, uma das características compartilhadas pela ASH e pela NASH é a presença de um infiltrado de células inflamatórias no tecido hepático resultado da uma inflamação crónica com origens distintas para cada patologia, conforme discutido anteriormente (Yeh e Brunt, 2007; Ramadori et al, 2008).

A análise histológica de fígados de pacientes com ASH e NASH permitiu perceber que os neutrófilos estão frequentemente associados a esse infiltrado (Tannapfel et al, 2012). Embora biologicamente a função de uma resposta inflamatória seja a de neutralizar os insultos e promover a reposição da normal homeostasia celular (McDonald e Kubes, 2011), a presença de neutrófilos pode contribuir para agravar as lesões iniciais e causar danos hepáticos adicionais no contexto da ASH e da NASH (Jaeschke, 2006).

1.4.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são as células mais abundantes do sistema imune (Kobayashi e DeLeo, 2009). São produzidos na medula óssea a partir de células estaminais que se diferenciam em neutrófilos maduros (Borregaard, 2010) e quando atingem a circulação sanguínea, o seu tempo médio de vida varia de 6 a 8 horas (Sadik *et al*, 2011). Têm aproximadamente 12-15µm de diâmetro e morfologicamente são classificados como células polimorfonucleadas por, apresentarem um núcleo lobulado e como granulócitos, porque possuem no seu citoplasma diversos grânulos delimitados por membrana que armazenam proteínas essenciais às suas funções (Luz, 2004).

Os neutrófilos circulam no sangue num estado quiescente (Kobayashi e DeLeo, 2009) e, em casos de infecção por microrganismos ou de lesão estéril, são rapidamente recrutados para os tecidos-alvo (Philipson e Kubes, 2011). A capacidade de migração dos neutrófilos é extremamente importante no contexto do sistema imune inato e a capacidade para encontrar os tecidos lesionados é a chave da resposta inflamatória (Kobayashi e DeLeo, 2009 (Kumar e Sharmab, 2010)). De facto, acumulando-se com grande facilidade nos tecidos afectados, poderão contribuir para a eliminação da maior parte das bactérias antes que estas causem danos graves ao organismo (Rybczynski, 2010).

1.4.2 Neutrófilos na Resposta Inflamatória

Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune a ser recrutadas para os tecidos periféricos em caso de infecção por parte de agentes patogénicos ou de uma lesão estéril (Sadik *et al*, 2011). Em ambos os casos, ocorre respectivamente, reconhecimento de PAMPs e de DAMPs por parte das células residentes, o que induz o recrutamento de neutrófilos (Philipson e Kubes, 2011) pela formação de gradientes de factores solúveis como interleucinas, citocinas e outros agentes pró-inflamatórios. As células endoteliais são activadas por estes factores, expressando nestas condições várias moléculas de adesão (Sanz e Kubes, 2012; Borrengaard, 2010), que permitem o início de um processo denominado de cascata de adesão que culmina com a diapedese de neutrófilos.

A activação de células endoteliais traduz-se num aumento da expressão de selectinas, responsáveis pelo primeiro contacto entre células do endotélio e os neutrófilos adjacentes. Este contacto inicial é mediado pelas E-Selectina e P-Selectina expressas no endotélio e por PSGL-1 (do inglês, *P-selectin glycoprotein ligand-1*) e L-Selectina (CD62L) expressa pelos neutrófilos (Philipson e Kubes, 2011; Sanz e Kubes, 2012; Borrengaard, 2010; Kobayashi e DeLeo, 2009; Sadik *et al*, 2011). Esta etapa permite que os neutrófilos em circulação sejam capturados por células do endotélio próximas da área inflamada. As mesmas moléculas medeiam o rolamento de neutrófilos através do endotélio. A L-Selectina é expressa constitutivamente na membrana dos neutrófilos e, depois de mediar esta primeira etapa do processo de adesão, é eliminada e entra na circulação sanguínea (Oommen et al, 2003).

Os neutrófilos na fase de rolamento detectam quimiocinas imobilizadas na membrana das células endoteliais activadas, o que provoca alterações conformacionais nas integrinas da superfície dos neutrófilos para estados de elevada afinidade (Philipson e Kubes, 2011; McDonald e Kubes, 2011). A activação das integrinas- $\beta 2$ LFA-1 (CD11a-CD18) e Mac-1 (CD11b-CD18) permite a adesão firme de neutrófilos a células do endotélio através da ligação às integrinas ICAM-1 e ICAM-2 (Kobayashi e DeLeo, 2009; Borrengaard, 2010; Philipson e Kubes, 2011). Após a adesão firme, os neutrófilos iniciam o processo de transmigração para o interior dos tecidos. Esta migração ocorre predominantemente através das *Tight-junctions* entre células do endotélio (Philipson e Kubes, 2011).

Esta fase é regulada pelas integrinas- $\beta 2$ LFA-1 e Mac-1 nos neutrófilos e por, ICAM-1 e PECAM-1 expressas em células do endotélio (Philipson e Kubes, 2011; Sadik *et al*, 2011; Borrengaard, 2010). A sequência de eventos que caracteriza a cascata de adesão está expressa na figura 1.3.

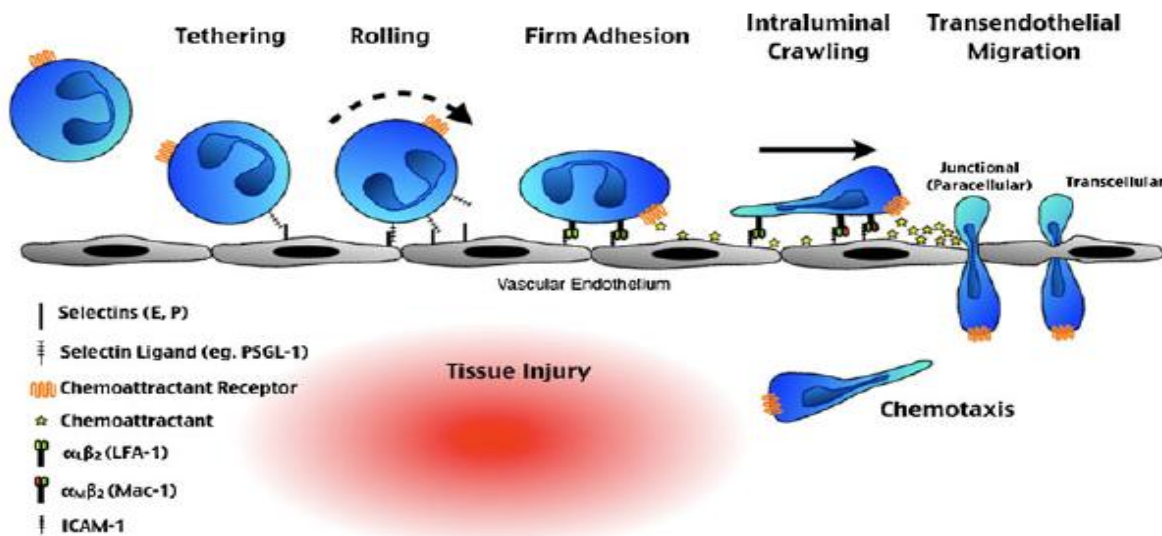


Figura 1.3- Cascata de adesão de neutrófilos (McDonald e Kubes, 2011). Representação das etapas de adesão, rolamento, adesão firme, diapedese e de quimiotaxia que medeiam a migração dos neutrófilos desde a corrente sanguínea até ao local da lesão.

Durante o processo de recrutamento, os neutrófilos contactam com quimiocinas presentes na superfície endotelial o que permite que a diapedese ocorra em zonas próximas do foco de lesão mas, uma vez nos tecidos, estes têm de migrar exactamente para as zonas lesionadas. Essa migração é mediada por quimiocinas que formam gradientes quimiotáxicos (McDonald e Kubes, 2011). As CXC quimiocinas são potentes agentes quimiotáxicos de neutrófilos e são produzidas, como referido, devido à activação de células imunes locais. Os neutrófilos são recrutados essencialmente por CXC quimiocinas : IL-8, MIP-2 e CINC-1 (Bautista, 2002; Feghali e Wright, 1997).

Neutrófilos que completam todas as fases do recrutamento até aos tecidos, encontram-se num estado de activação superior a neutrófilos que circulem na corrente sanguínea (Borrengaard, 2010). Nos tecidos, os neutrófilos contribuem para a manutenção da resposta inflamatória pela produção de citocinas, quimiocinas e de factores que promovem também o recrutamento de mais neutrófilos. A presença de neutrófilos totalmente activados é de extrema importância na defesa contra infecções bacterianas, mas a existência de mecanismos que controlem o seu influxo é fundamental para limitar danos ou lesões adicionais infligidas por estas células nos tecidos para os quais são recrutados (Sadik *et al*, 2011).

1.4.3 Actividade antimicrobiana

Os neutrófilos eliminam microrganismos através de produção de ROS e por libertação de péptidos e proteases contidos nos seus grânulos citoplasmáticos, numa sequência de eventos que começa com a fagocitose do agente infeccioso (Kobayashi e DeLeo, 2009; Kobayashi *et al*, 2005). A figura 1.4 ilustra os vários passos do processo antimicrobiano promovido por neutrófilos.

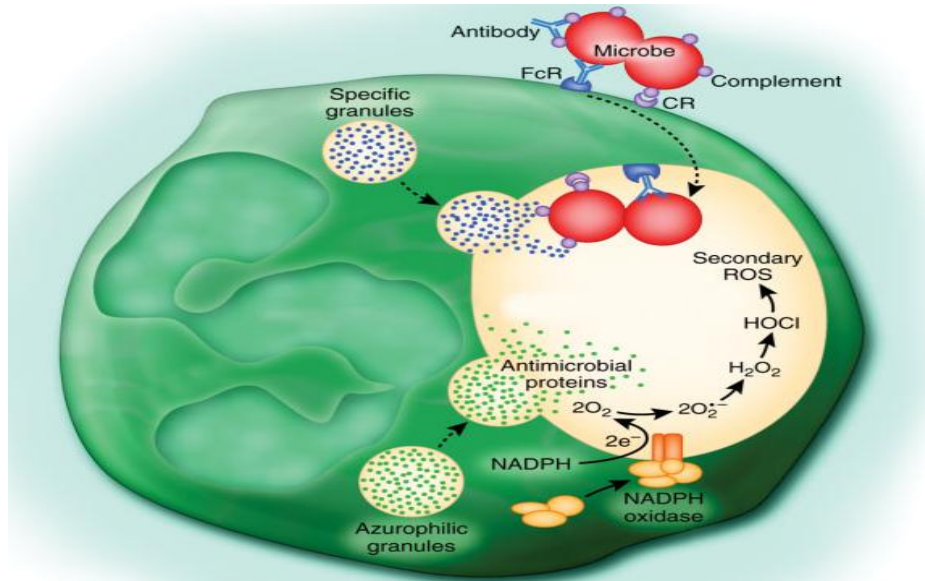


Figura 1.4- Actividade antimicrobiana dos neutrófilos (Kobayashi e DeLeo 2009). Os microrganismos são opsonizados e retidos em fagossomas onde são eliminados pelos processos de desgranulação e produção de ROS.

O processo de fagocitose de microrganismos nos locais de infecção é facilitado pelo reconhecimento por parte dos receptores TLR presentes na superfície dos neutrófilos. A eficácia da fagocitose é também promovida pela opsonização dos microrganismos com anticorpos e sistema complemento, que contactam com receptores específicos nos neutrófilos. Estes contactos iniciam a fagocitose pela invaginação da membrana do neutrófilo em locais adjacentes. A membrana dos neutrófilos envolve por completo os microrganismos, retendo-os em vacúolos denominados de fagossomas (Kobayashi e DeLeo, 2009). A morte de microrganismos contidos nos fagossomas pela produção de ROS deve-se à acção da enzima NADPH oxidase, um complexo enzimático que é estruturalmente montado com o decorrer da activação de neutrófilos. A NADPH oxidase é responsável pela produção de ROS como: O_2^- (ião superóxido), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCL) e radical hidroxilo (OH). A síntese destes compostos é conhecida como explosão oxidativa e

caracteriza-se por um aumento no consumo de oxigénio e glicose. A importância da produção de ROS é revelada pela existência de uma patologia a Granulomatose Crónica onde, alterações genéticas na enzima NADPH estão associadas a infecções bacterianas e virais (El-Benna *et al*, 2005). A acção combinada entre a produção de ROS e a libertação do conteúdo granular no fagossoma, ou seja, processo de desgranulação, destrói o agente infeccioso e leva à morte dos neutrófilos por apoptose (Sadik *et al*, 2011).

A produção de *NET's* (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*), é um mecanismo adicional que os neutrófilos têm no combate a produtos bacterianos (Philipson e Kubes, 2011) e é uma alternativa à sua morte por apoptose. Consiste na libertação do seu conteúdo de DNA e das proteínas antimicrobianas contidas nos grânulos, formando estruturas em forma de rede com capacidade para reterem bactérias (Borrengaard, 2010).

1.4.3.1 Activação de Neutrófilos

Os neutrófilos em circulação não possuem todas as características que lhes permitem cumprir eficazmente as suas funções antimicrobianas (Condliffe *et al*, 1998). A plenitude das suas capacidades é alcançada através de uma sequência ordenada de eventos que envolve a passagem dos neutrófilos de um estado quiescente para um estado de pré-activação que antecede o estado de activação total (Eeden *et al*, 1999). O processo de pré-activação é denominado de *priming* e possibilita que os neutrófilos respondam de forma mais vigorosa perante o reconhecimento de agentes bacterianos (Smith, 1994). A resposta oxidativa pode aumentar até 20 vezes quando os neutrófilos são expostos previamente a agentes de *priming* como TNF- α , IL-6 e endotoxina. Além da potenciação da resposta oxidativa, o *priming* induz alterações nas expressões de receptores de membrana em neutrófilos associados ao processo de diapedese. Alguns agentes estimulatórios têm a capacidade de eliminar a L-Selectina e aumentar a expressão de integrinas, o que correlaciona os mecanismos de *priming* com funções na modulação do recrutamento de neutrófilos na resposta inflamatória (Condliffe *et al*, 1998).

A activação dos neutrófilos é um processo que, dependendo das concentrações dos estímulos, ocorre através da estimulação gradual dos mecanismos de quimiotaxia, desgranulação e explosão oxidativa (Eeden *et al*, 1999). Estes eventos sequenciais permitem que só os neutrófilos que extravasem para o interior dos tecidos estejam totalmente activados e prontos a comportarem-se como células fagocíticas (Jaeschke e Hasegawa, 2006), mantendo a integridade dos tecidos (Eeden *et al*, 1999).

Apesar da importância dos processos de pré-activação em permitir uma resposta proporcional ao estímulo recebido (Santos, 2007), o contacto prolongado dos neutrófilos em circulação com concentrações elevadas de agentes de *priming* pode ser responsável por efeitos citotóxicos observados na patologia de algumas doenças inflamatórias (Smith, 1994).

1.4.4 Neutrófilos nas esteato-hepatites alcoólicas e não alcoólicas

A presença histológica de neutrófilos na ASH e na NASH ocorre em consequência dos processos inflamatórios associados (Tannapfel *et al*, 2011) e tem como objectivo a eliminação dos agentes responsáveis pela sua activação (Jaeschke e Hasegawa, 2006). O recrutamento de neutrófilos para o ambiente hepático, apesar de semelhante aos mecanismos gerais observados para outros tecidos, contempla algumas diferenças devido à sua complexa vasculatura (Labor *et al*, 2007). A diferença mais notória prende-se com a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais hepáticas que são diferentes das presentes noutros órgãos (Lee e Kubes, 2008). Por exemplo, os neutrófilos são sequestrados da corrente sanguínea pela acção da molécula de adesão VAP-1, cuja expressão é elevada mesmo na ausência de inflamação (Labor *et al*, 2007; Adams *et al*, 2010).

A associação entre lesões hepáticas e neutrófilos foi demonstrada em alguns modelos experimentais. O recrutamento continuado de neutrófilos para o tecido hepático resulta em lesões através da produção excessiva de ROS que induzem um estado de stress oxidativo em hepatócitos tendo como consequência a morte por necrose (Ramaiah e Jaeschke, 2007). Porém, e apesar do seu recrutamento para o fígado ser essencial para o desenvolvimento dessas lesões, a presença de neutrófilos não justifica por si o agravamento das lesões iniciais (Jaeschke e Hasegawa, 2006).

Por outro lado, os mecanismos que explicam como os neutrófilos contribuem para a patogénese da ASH e da NASH não são ainda conhecidos (Farrell *et al*, 2011). Sabe-se hoje em dia que no contexto das doenças hepáticas de origem alcoólica, os neutrófilos de doentes com ASH sobreposta a cirrose apresentam-se já pré-activados em circulação (Mokerjee *et al*, 2007; Tritto *et al*, 2011). Estes estudos indicam que neutrófilos destes possuem um potencial oxidativo superior e uma capacidade de fagocitose inferior, quando comparados com neutrófilos de indivíduos saudáveis. Esta disfunção dos neutrófilos é justificada pela presença de níveis mais elevados de endotoxina na circulação sanguínea destes pacientes. Supõem-se que a endotoxina tenha um efeito de *priming* nos neutrófilos circundantes (Mokerjee *et al*, 2007). O estado de activação superior para os neutrófilos em circulação conduz a uma produção exagerada de ROS. Como este processo é dependente de energia tal como a fagocitose, o aumento de ROS leva consequentemente a uma diminuição da capacidade fagocitária, tornando os neutrófilos incapazes de responder a um insulto infeccioso adicional (Mokerjee *et al*, 2007; Leber *et al*, 2009), e assim, aumenta o risco de infecção e mortalidade nestes doentes (Tritto *et al*, 2011).

Para além da pré-activação ao nível da explosão oxidativa, a presença de neutrófilos em estado de activação superior já foi também associada com uma diminuição da expressão membranar dos níveis de L-Selectina em pacientes com cirrose alcoólica (Taieb, 2000). Apesar de a pré-activação de neutrófilos ser um requisito para alcançar as suas funções, um *priming* excessivo e descontrolado poderá levar a

lesões nos tecidos (Kitchen *et al*, 1996; Condliffe *et al*, 1998). Desta forma, esta disfunção registada nos neutrófilos poderá influenciar o desenvolvimento das doenças hepáticas alcoólicas, de entre as quais a ASH.

A bibliografia é ainda mais escassa em relação a estudos com neutrófilos na NAFLD. Apesar da evidência de que os níveis de endotoxina plasmática em pacientes com NAFLD são, tal como para as doenças alcoólicas, mais elevados do que os controlos (Harte *et al*, 2010), o estado de activação e a consequente função dos neutrófilos no espectro da NAFLD permanecem desconhecidos.

O esclarecimento dos mecanismos pelos quais os neutrófilos provocam danos hepáticos e, das suas funções no contexto das ASH e da NASH, poderá contribuir para o desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos.

1.5 Objectivo

Esta tese tem como objectivo contribuir para a caracterização funcional dos neutrófilos na esteato-hepatite alcoólica e não alcoólica. Tendo em conta as semelhanças histopatológicas presentes nas duas patologias pretendeu-se averiguar se, tal como para a ASH sobreposta a cirrose, também a NASH seria caracterizada por uma disfunção nos neutrófilos na circulação sanguínea.

De forma a testar esta hipótese, esta tese tem como objectivos específicos o estudo por citometria de fluxo da capacidade de fagocitose, da explosão oxidativa e da expressão de marcadores funcionais em neutrófilos de pacientes de dois grupos experimentais, a saber: doentes com cirrose alcoólica compensada e doentes com NASH.

2. Materiais e Métodos

2.1 Lista de Material

- Pipetas Gilson 10,20,100,200,1000 µL
- Micro tubos Eppendorf 1,5ml
- Tubos Falcon Corning®15,50 ml
- Vortex
- Centrifuga HERMLE
- Centrifuga refrigerada Multifuge
- Banho de água termostataizado a 37° C
- Luvas
- Arca frigorífica -4°C, -20° C e -80°C
- Copos de laboratório Normax
- Termómetro
- Tubos Citómetro BD Bioscience
- Pontas de pipeta
- Tubos Colheita de sangue VACUETTE® HL e K3E
- Banho de gelo
- Citómetro de Fluxo BD Bioscience® LSR

2.2 Lista de anticorpos

- PerCP anti-human CD16. BioLegend
- PerCP-eFluor® 710 Anti-Human CD62L (L-Selectin). eBioscience
- PE Conjugated Anti-human CD11b. eBioscience
- Alexa Fluor Conjugated Anti-human CD11b .eBioscience
- FITC Anti-human CD66b. Biolegend

2.3 Lista Reagentes

- Acetato de forbol miristrato (PMA); SIGMA
- N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP); SIGMA
- Dihidrorodamina 123 (DHR 123); SIGMA
- FACS Lyzing BD Bioscience
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) Invitrogen
- Paraformaldeído 6%; SIGMA
- Dimetilsulfóxido (DMSO); SIGMA

2.4 Métodos

2.4.1 Colheita de amostras de sangue

Analísaram-se amostras de sangue proveniente de 16 doadores saudáveis, de 12 doentes com cirrose alcoólica compensada e de 6 doentes com esteato-hepatite não alcoólica.

As amostras de sangue de indivíduos saudáveis foram colhidas ao abrigo de um protocolo de colaboração entre o Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e o Instituto Português do Sangue. O Departamento de Gastroenterologia do Hospital Santa Maria facultou as amostras de sangue de indivíduos doentes, mediante consentimento assinado por cada participante no estudo.

O sangue foi recolhido para os seguintes tubos:

- VACUETTE® com anticoagulante Heparina Lítica (HL) para avaliação da fagocitose e de explosão oxidativa de neutrófilos.
- VACUETTE® com anticoagulante K₃EDTA (K3E), para análise de expressão de marcadores de superfície de neutrófilos

Todas as amostras de sangue foram processadas num período máximo de 1 hora após a colheita e analisadas no citómetro de fluxo BD Bioscience® LSR num período máximo de 4 horas após o início de cada protocolo, à excepção das amostras para a avaliação da expressão de marcadores de superfície de neutrófilos que foram analisadas no dia seguinte à conclusão do protocolo.

2.4.2 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica baseada na utilização de radiação laser (Bertho, 2001) que permite medir e analisar simultaneamente múltiplas características físicas de partículas simples, sobretudo células. É utilizada para obter diagnósticos clínicos e em investigação científica e tem como princípio encaminhar uma solução celular em direcção a uma fonte de radiação laser (Brown e Wittwer, 2000). Devido aos fenómenos de difracção de luz resultantes, a citometria de fluxo permite medir o tamanho e a complexidade interna de partículas ou células com tamanho compreendido entre 0,2 e 150 μ m. Dependendo do protocolo experimental, pode também ser medida a intensidade de fluorescência associada, caso sejam utilizados marcadores celulares fluorescentes apropriados (Biosciences, 2000). A figura 2.1 mostra o esquema geral de um citómetro de fluxo que é constituído por 3 sistemas fundamentais: sistema fluídico, sistema óptico e sistema electrónico (Biosciences, 2000; Rahman, 2005; Bertho, 2001).

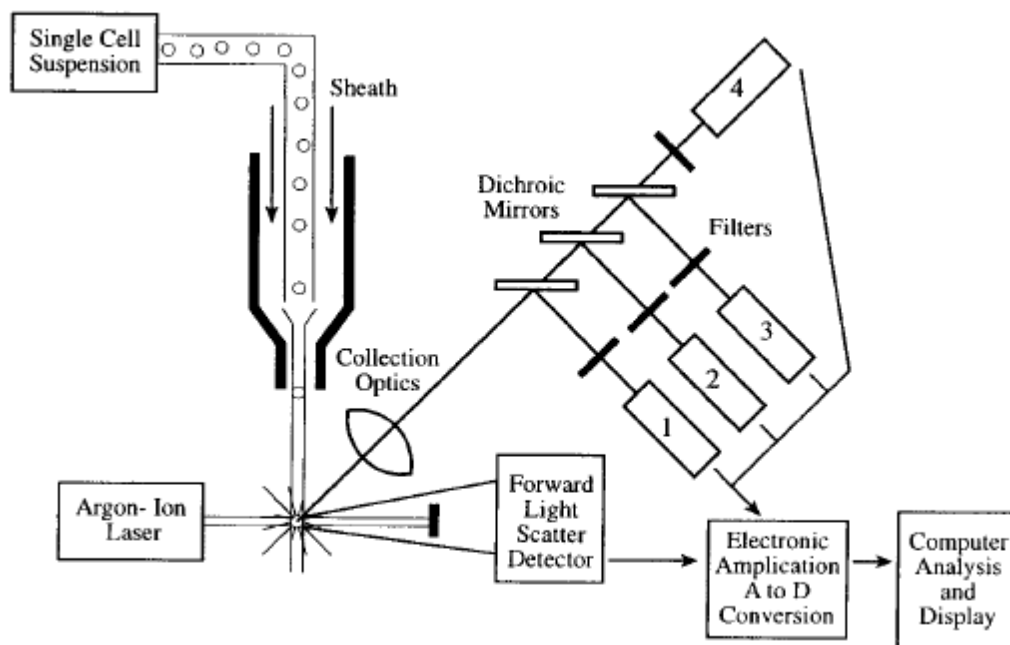


Figura 2.1- Esquema geral de um citómetro de fluxo (Brown e Wittwer, 2000). Células individuais são direccionadas pelo sistema fluídico para o sistema óptico e os sinais são recolhidos por detectores de dispersão de luz e de fluorescência presente no sistema electrónico e processados por computador.

O sistema fluídico é responsável pelo transporte das células em suspensão através de uma coluna até ao laser. Para que as células atinjam o laser individualmente, são canalizadas para uma câmara e envolvidas num fluxo contínuo de líquido que promove o alinhamento das células em direcção ao laser (Rahman, 2005). Em relação ao sistema óptico, este é constituído por lasers que iluminam as células provenientes da camara fluídica e por filtros que direccionam a luz resultante para detectores apropriados para cada comprimento de onda (Biosciences, 2000). O número de detectores varia consoante o equipamento (Bertho, 2001). Por cada célula que atravessa um feixe de luz ocorre dispersão de luz frontal, FSC (do inglês *Forward-scattered light*), dispersão de luz lateral, SSC (do inglês *Side-scattered light*) e, conforme o protocolo utilizado, pode ser captado o sinal de fluorescência (Biosciences, 2000).

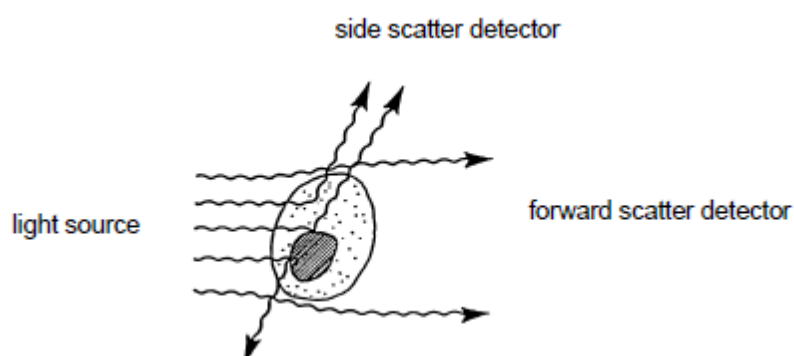


Figura 2.2- Propriedades de dispersão de luz por uma célula (Biosciences, 2000). Ao atravessar um feixe de luz, a célula dispersa luz frontalmente (FSC) e lateralmente (SSC)

O FSC é proporcional ao tamanho da célula e o SSC fornece informação relativa á complexidade da mesma, conforme ilustrado na figura 2.2. Cada célula tem um intervalo de valores de FSC e SSC característicos. A combinação das duas medidas é utilizada para distinguir diversos tipos celulares em amostras heterogéneas. Por cada célula que individualmente atravessa o sistema de lasers regista-se um evento (Rahman, 2005).

O sistema electrónico é responsável pelo processamento do sinal de luz que chega aos detectores pois converte sinais de luz em sinais eléctricos para serem processados em computador. Quando a luz chega a um fotodetector, forma-se uma pequena corrente eléctrica que é amplificada logaritmicamente em sinais suficientemente grandes para que sejam analisados graficamente (Rahman, 2005).

2.4.3 Fluorocromos

A análise de células em suspensão por citometria de fluxo pode ser complementada com a utilização de anticorpos conjugados com fluorocromos. Estes últimos, são compostos que absorvem luz a um determinado comprimento de onda e emitem fluorescência a um comprimento de onda superior. Cada fluorocromo absorve luz a um determinado comprimento de onda específico, o que faz com que os seus electrões se excitem para um estado de energia máximo, e que decaiam em seguida para um estado de relaxamento de energia ligeiramente inferior. Os electrões neste estado de relaxamento libertam a energia excedente à medida que voltam ao estado inicial, num processo denominado de fluorescência. Como a energia de emissão é inferior à energia de absorção, a fluorescência é emitida a comprimentos de onda superiores ao da radiação absorvida. É fundamental que a luz de emissão se distinga claramente da de absorção. Assim, um fluorocromo é tanto melhor quando maior for a diferença entre o seu estado de energia máximo e o estado de relaxamento subsequente (Rahman,2005).

Quando um fluorocromo é conjugado a um anticorpo específico para um dado antígeno de superfície, é possível identificar um tipo particular de células, como representado na figura 2.3, consoante a sua expressão na amostra celular utilizada.

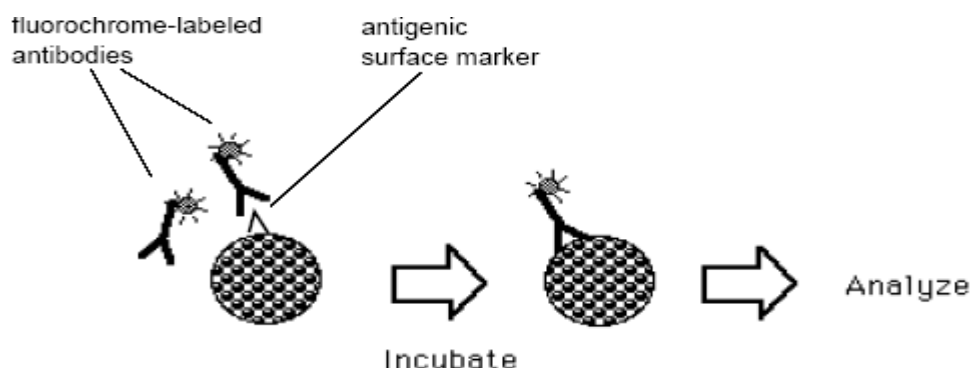


Figura 2.3- Ligação específica de um anticorpo conjugado com um fluorocromo a um antígeno celular (Biosciences, 2000). As células podem ser incubadas com anticorpos dirigidos especificamente para certos antígenos de superfície e conjugados com fluorocromos de forma a analisar a expressão celular destes antígenos por citometria de fluxo.

Em população mistas, diferentes fluorocromos podem ser utilizados para identificar os diversos tipos celulares presentes. A grande variedade de fluorocromos e de anticorpos disponível, conjugada com a análise multiparamétrica por citometria de fluxo, permite também analisar diversas funções de um tipo celular na mesma população (Eeden, 1999).

2.4.4 Análise de dados

Os dados armazenados pelo computador do citômetro de fluxo contêm informação variada que pode ser analisada de diversas formas. Quando analisamos populações mistas é importante seleccionar as células do nosso interesse, excluindo as que não fazem parte do âmbito da experiência (Biosciences, 2000). A selecção de uma população específica é alcançada através de um *gate*. Um *gate* define-se como um subconjunto de dados usado para analisar e definir células ou partículas que partilhem as mesmas características físicas (Biosciences, 2000). Na figura 2.4 está representado um *gate* que delimita a população de neutrófilos numa amostra de sangue total.

A *posteriori*, as propriedades da população escolhida podem ser analisadas através de histogramas, que são gráficos monoparamétricos, ou de gráficos de DotBlot, em que podem ser analisados dois parâmetros (Biocience, 2000).

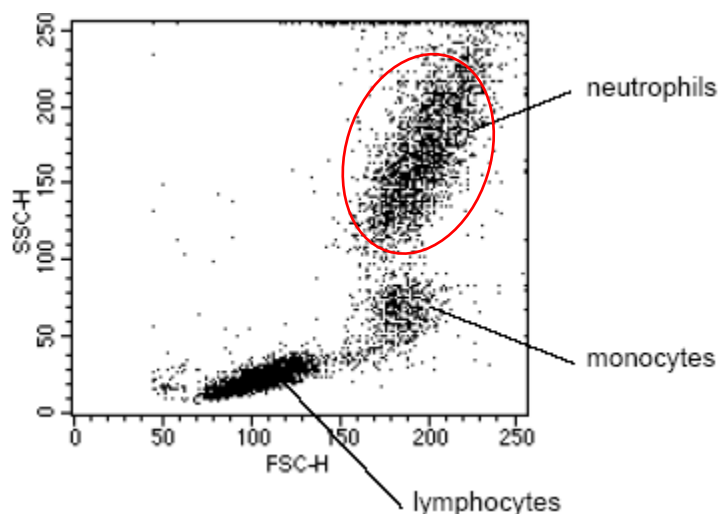


Figura 2.4- Gráfico SSC vs FSC (Bioscience, 2000). A análise de uma amostra de sangue total após lise de eritrócitos permite a obtenção de um gráfico FSC por SSC, onde se pode identificar a população de neutrófilos.

2.4.5 Avaliação funcional dos neutrófilos

2.4.5.1 Fagocitose

2.4.5.1.1 Metodologia

A capacidade fagocítica dos neutrófilos foi medida através do uso do Kit PHAGOTEST™. Este Kit é utilizado para a determinação quantitativa da fagocitose em monócitos e granulócitos em amostras de sangue heparinizado (Glycotope, 2009). O teste inicia-se com a incubação das amostras de sangue total com bactérias E.coli opsonizadas e marcadas com o fluorocromo fluoresceína (FITC). Após lavagem para eliminar bactérias não fagocitadas e fluorescência não específica, as amostras são lisadas de forma a eliminar os eritrócitos e fixadas (Glycotope, 2009). Para identificação dos neutrófilos as amostras são posteriormente incubadas com o anticorpo anti-CD16 humano-PerCP. Por fim, a análise da capacidade fagocítica é medida com recurso à citometria de fluxo.

Ao fagocitarem bactérias marcadas fluorescentemente, os neutrófilos passam a emitir fluorescência detectável pelo canal de FITC, podendo-se desta forma determinar a sua capacidade fagocítica. Para tal, o ensaio de fagocitose é efectuado a uma temperatura de 37°C que favorece este processo celular, e comparado com idêntico ensaio efectuado em condições que não o favorecem, nomeadamente a 4°C (amostra controlo). A quantidade de bactérias fagocitadas por neutrófilo é directamente proporcional à intensidade de fluorescência em FITC de cada célula, quando se utiliza esta técnica (Biosciences, 2000; Glycotope, 2009).

2.4.5.1.2 Procedimento experimental

Para a realização do ensaio de fagocitose, utilizou-se o protocolo do Kit PHAGOTEST™ com algumas alterações. Prepararam-se de início 6 aliquotas de sangue heparinizado (3 controlo e 3 testes) em tubos Falcon de 15mL que foram incubadas de seguida num banho de gelo durante 10 minutos. A cada uma das amostras, adicionaram-se 20µL de bactérias opsonizadas com E.coli (Reagente B), previamente arrefecidas em gelo. As amostras de teste foram colocadas num banho-maria a 37° C durante 10 minutos, enquanto as amostras controlo ficaram em gelo durante o mesmo período de tempo.

Passado o tempo de incubação, as amostras de teste foram colocadas rapidamente em gelo para interromper a fagocitose e de seguida, adicionou-se 100µL de solução de extinção (Reagente C) a cada uma das seis amostras. Depois de se juntar 3mL de solução de lavagem (Reagente A) a cada amostra e de

se misturar em vórtex, estas amostras foram centrifugadas a 4°C durante 5 minutos a 250g. Este passo de centrifugação foi repetido nas mesmas condições para todas as amostras, após a eliminação do sobrenadante e de nova adição de 3mL de solução de lavagem a cada. Após nova eliminação do sobrenadante, foram adicionados a cada amostra 2mL de solução lisante 1X (Reagente D), com o cuidado de se agitar muito bem com vórtex. Deixou-se incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 5 minutos a 250g. Depois de rejeitar o sobrenadante por inversão dos tubos Falcon, as amostras foram lavadas com 3ml de solução de Lavagem por duas vezes nas condições da centrifugação anterior. Depois de retirado o máximo de sobrenadante sem perturbação do precipitado, todas as amostras foram ressuspensas em 297µl de HBSS e incubadas com 3µl de anticorpo anti-CD16 humano-PerCP durante 30 minutos em gelo. Adicionou-se em seguida 2 mL de solução de lavagem a cada amostra e centrifugou-se a 4°C durante 5 minutos a 250g. Por fim, o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento celular ressuspenso em 500µl de HBSS e transferido para tubos de citómetro para posterior análise.

2.4.5.1.3 Aquisição e análise em citometria de fluxo

Durante a análise no citómetro de fluxo, foram coleccionados dados para um total de 10000 eventos por amostra. Tendo em conta a lise de eritrócitos efectuada durante o ensaio de fagocitose, nas suspensões celulares analisadas podiam existir os diferentes tipos de leucócitos normalmente encontrados em circulação, de entre os quais se destacam os neutrófilos, linfócitos e monócitos. Desta forma, o passo inicial para qualquer análise constituiu a identificação da população de neutrófilos nessa suspensão celular com recurso ao gráfico DotBlot de FSC por SSC, no qual se delimitou então um *gate* nas células com tamanho e granulosidade características de neutrófilos. Neste ensaio, a confirmação de que a população escolhida correspondia de facto a neutrófilos foi reforçada pela análise de marcação para o antígeno de superfície CD16, expresso constitutivamente em neutrófilos (Fleit, 1991). Para esta marcação, utilizou-se o anticorpo anti-CD16 humano conjugado ao fluorocromo PerCP, sendo que a aquisição de eventos foi efectuada no canal para detecção de sinal de fluorescência de PerCP.

Dentro do *gate* definido para neutrófilos que emitam fluorescência em PerCp, adquiriram-se também dados relativos à detecção de sinal de FITC por forma a avaliar-se o sinal respeitante à fagocitose de bactérias. Para tal, a aquisição de dados foi acompanhada por um histograma de emissão em FITC, a partir do qual é possível determinar a ocorrência de fagocitose.

2.4.5.2 Explosão Oxidativa

2.4.5.2.1 Metodologia

A explosão oxidativa é uma etapa complementar ao processo de fagocitose que permite a completa remoção e eliminação dos invasores ao organismo. É caracterizada pela produção de ROS por parte do complexo enzimático NADPH oxidase. Neste sentido, a produção de ROS funciona como medida do grau de activação dos neutrófilos. Esta produção de ROS pode ser avaliada mediante a determinação dos níveis celulares de ião superóxido ou de peróxido de hidrogénio. Uma forma de efectuar estas determinações numa dada população celular por citometria de fluxo passa por analisar a sua capacidade em oxidar substâncias que especificamente ou no estado reduzido ou no oxidado emitam fluorescência. Neste estudo, a técnica utilizada consiste em avaliar a oxidação da dihidrorodamina 123 (DHR 123) pelo peróxido de hidrogénio. A DHR 123 é um composto que penetra nas células por difusão e uma vez no espaço intracelular, é oxidada pelas ROS a rodamina 123 (RHO), a qual emite fluorescência a 530 nm. Como a RHO se liga à membrana celular, o sinal de fluorescência medido é exclusivamente proveniente do interior dos neutrófilos e proporcional à capacidade de produção de ROS pelos mesmos (Walrand et al, 2003).

De forma a estudar o potencial da população de neutrófilos para a produção destas espécies reactivas, estas células são ensaiadas em diferentes condições experimentais na ausência e presença de activadores específicos, nomeadamente com fMLP e com PMA. O fMLP é um tripéptido sintético que induz um estado de pré-activação funcional em neutrófilos (Hashiguchi *et al*, 2005; Eeden, 1999). O PMA é também um indutor de activação dos neutrófilos, mas mais potente que o fMLP. O PMA é um ionóforo solúvel na membrana plasmática, que activa directamente vias intracelulares que conduzem à máxima produção de ROS pelo complexo NADPH oxidase (Bruce *et al*, 1997). Os compostos DHR, FMLP e PMA foram reconstituídos em DMSO e armazenados em aliquotas de 10µL. Prepararam-se aliquotas de DHR e FMLP com uma concentração de 0,01M, as quais foram armazenadas a -80°C e -20°C respectivamente. As aliquotas de PMA foram reconstituídas para uma concentração de 1,62mM e foram armazenadas a -80°C. Antes de cada ensaio prepararam-se diluições em tampão HBSS, das soluções stock armazenadas, para concentrações de DHR de 10⁻⁵ M, FMLP de 10⁻⁴M e de PMA de 1,35x10⁻⁵M.

2.4.5.2.2 Procedimento experimental

Prepararam-se 10 aliquotas de 100 μ L de sangue heparinizado em tubos Eppendorf de 1,5mL que foram utilizadas para efectuar triplicados para as incubações de PMA, FMLP, DHR e um controlo negativo. De início, adicionou-se 11 μ L das diluições dos activadores PMA e FMLP aos respectivos tubos para uma concentração final de 1,35x10⁻⁶M e 10⁻⁵M respectivamente. Aos restantes, adicionou-se o mesmo volume de HBSS. Após agitação em vortex, os tubos foram incubados durante 10 minutos num banho a 37°C

A todos os tubos foram posteriormente adicionados 12 μ L da diluição de DHR 10⁻⁵M, para uma concentração final de 10⁻⁶M, à excepção do tubo controlo ao qual se adicionou o mesmo volume de HBSS. Após agitação em vortex, todos os tubos foram novamente incubados num banho durante 10 minutos a 37°C. Todos os tubos foram de seguida colocados à temperatura ambiente e lisados com 1 mL de solução FACS Lysing 1X durante 20 minutos. Os tubos foram então centrifugados durante 5 minutos a 4000 rcf sendo depois os sobrenadantes rejeitados e os sedimentos celulares lavados com 1 mL de tampão HBSS por centrifugação nas condições anteriores. Após repetição deste passo de lavagem com HBSS, cada sedimento celular foi ressuspenso em 297 μ L de tampão HBSS e incubados com 3 μ L de anticorpo anti-CD16 humano-PerCP. Com excepção do tubo controlo, ao qual se adicionaram 300 μ L de HBSS. Incubaram-se os tubos em gelo durante 30 minutos e de seguida, adicionou-se 200 μ L de tampão HBSS a cada tubo. O volume total foi transferido para tubos de citometro para posterior análise.

2.4.5.2.3 Aquisição e análise em citometria de fluxo

A definição do *gate* de neutrófilos e a confirmação de que a população seleccionada correspondia de facto a neutrófilos foi efectuada como no protocolo de avaliação da fagocitose.

A análise da explosão oxidativa envolveu paralelamente a aquisição de dados no canal de fluorescência de FITC que permitiu analisar a fluorescência emitida pela RHO. Como indicador da produção de ROS, a fluorescência emitida por este composto permitiu quantificar a explosão oxidativa da população de neutrófilos nas diferentes condições experimentais utilizadas.

2.4.5.3 Expressão de marcadores de superfície de neutrófilos

2.4.5.3.1 Metodologia

Este protocolo permitiu avaliar o grau de activação dos neutrófilos, através da sua incubação com anticorpos específicos para diferentes antígenos de superfície. Foram utilizados anticorpos acoplados a fluorocromos, com emissão de luz a um comprimento de onda específico, de modo a que para a mesma população de neutrófilos fosse possível analisar a expressão de diferentes marcadores do estado de activação. Neste ensaio estudou-se a expressão da L-Selectina (CD62L), da integrina CD11b e da glicoproteína de membrana CD66b, pela incubação das amostras com os seguintes anticorpos : anti-CD62L humano-PerCP (para CD62L), anti-CD11b humano-PE e anti-CD11b act humano-APC (para CD11b total e CD11b activada respectivamente) e anti-CD66b humano- FITC (para CD66b).

2.4.5.3.2 Procedimento experimental

Prepararam-se 7 aliquotas de 100µL de sangue colhido com anticoagulante K3E em tubos Eppendorf de 1,5ml. A cada um destes tubos, adicionou-se depois 1mL de solução de lise 1X (BD FACS Lysing) para se proceder à lise de eritrócitos. Após incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 4000 rcf. Terminada a centrifugação, os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos ressuspensos novamente em 1 ml de solução de lise 1X (BD FACS Lysing), incubados durante 5 minutos a temperatura ambiente e depois centrifugados novamente nas condições anteriores. De seguida, os sedimentos foram lavados duas vezes com 1mL de HBSS por centrifugação durante 5 minutos a 4000rcf. Finalizada a lavagem, os sedimentos foram ressuspensos em HBSS e as amostras foram marcadas com 3µL de cada anticorpo para um volume total de 300µL. O volume de HBSS adicionado a cada amostra e a distribuição dos diversos anticorpos por amostra estão indicados na tabela 2.2. Em seguida, as amostras foram incubadas durante 30 minutos em gelo e uma vez concluída a incubação, centrifugadas durante 5 minutos a 4000 rcf,. Após lavagem com HBSS por centrifugação durante 5 minutos a 4000 rcf, os sedimentos foram ressuspensos em 500 µL de paraformaldeído 1% e as amostras armazenadas a 4°C até à sua análise por citometria de fluxo.

Tabela 2.1- Volumes de HBSS e de anticorpos adicionados para marcação das amostras.

Tubos	Volumes de HBSS incompleto adicionado (µL)	Anticorpo
1	300	-
2	297	anti-CD11b humano- PE
3	297	anti-CD11b act humano-APC
4	297	anti-CD66b humano-FITC
5	297	anti-CD62L humano-PerCP
6	294	anti-CD62L humano-PerCP + anti-CD66b humano-FITC
7	294	anti-CD11b humano- PE + anti-CD11b act humano-APC

2.4.5.3.3 Aquisição e análise em Citometria de fluxo

Neste ensaio, a definição do *gate* correspondente a neutrófilos foi efectuada por análise de DotBlot de FSC por SSC. De seguida, definiu-se um *gate* secundário com recurso ao gráfico FSC por FSC-W, cujo parâmetro FSC-W permite a exclusão de dupletos de células (Tzur, 2011). Após estes procedimentos, adquiriram-se 10000 eventos para cada tubo de marcação. A análise dos dados obtidos nos diferentes canais de fluorescência incluiu histogramas correspondentes à emissão de fluorescência pelos diferentes anticorpos utilizados bem como gráficos DotBlot de todas as combinações de marcadores possíveis.

2.5 Tratamento de resultado e análise estatística

A análise dos dados obtidos no citómetro de fluxo foi inicialmente efectuada no programa FlowJo. O posterior tratamento dos dados obtidos foi efectuada no software informático Microsoft® Excel 2010. Todas as figuras que espelham graficamente os resultados obtidos, assim como as análises estatísticas subjacentes, foram elaboradas com recurso ao software GraphPad Prism 5. Para uma comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney U test. Os resultados são apresentados na forma de média \pm SEM e são considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Características dos pacientes

No presente trabalho, utilizaram-se amostras de sangue de 3 grupos experimentais: (i) um grupo controlo de indivíduos saudáveis sem qualquer diagnóstico referente a doenças hepáticas (n=16; designado por Controlo); (ii) um grupo de doentes com diagnóstico comprovado de cirrose alcoólica compensada (n=12; designado por CIR) e; (iii) um grupo de doentes no qual foram englobados doentes com quadro clínico comprovado de esteato-hepatite não alcoólica (n=6; designado por NASH). É de salientar que no grupo CIR todos os pacientes apresentam valores de *Child-Pugh Score* de 5. Como tal, agrupam-se na classe de *Child A* e consequentemente, apresentam uma cirrose bem compensada (MedicalCriteria, 2010).

3.2 Fagocitose

Como referido anteriormente, no ensaio de fagocitose avaliou-se a capacidade fagocítica em neutrófilos por citometria de fluxo com recurso a bactérias marcadas com fluoresceína (FITC). A figura 3.1 ilustra a análise efectuada para cada amostra de acordo com o procedimento descrito na secção de Materiais e Métodos, sendo que a título de exemplo, se apresenta um histograma referente ao sinal detectado no canal de FITC para cada grupo experimental.

A partir dos dados recolhidos referentes às diversas amostras para controlos e doentes, determinou-se para cada uma a média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) medida no canal FITC, que é proporcional ao número de bactérias fagocitadas por neutrófilos. Com base nestes valores, calculou-se posteriormente o valor de GMFI médio e respectivo erro associado para cada grupo experimental. Os resultados obtidos foram $42014,38 \pm 1426,20$ para grupo controlo; $40126,39 \pm 2861,82$ para o grupo CIR e de $42488,14 \pm 1584,92$ para doentes com NASH. Estes resultados são apresentados graficamente na figura 3.2, sendo que a sua análise estatística não revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais analisados.

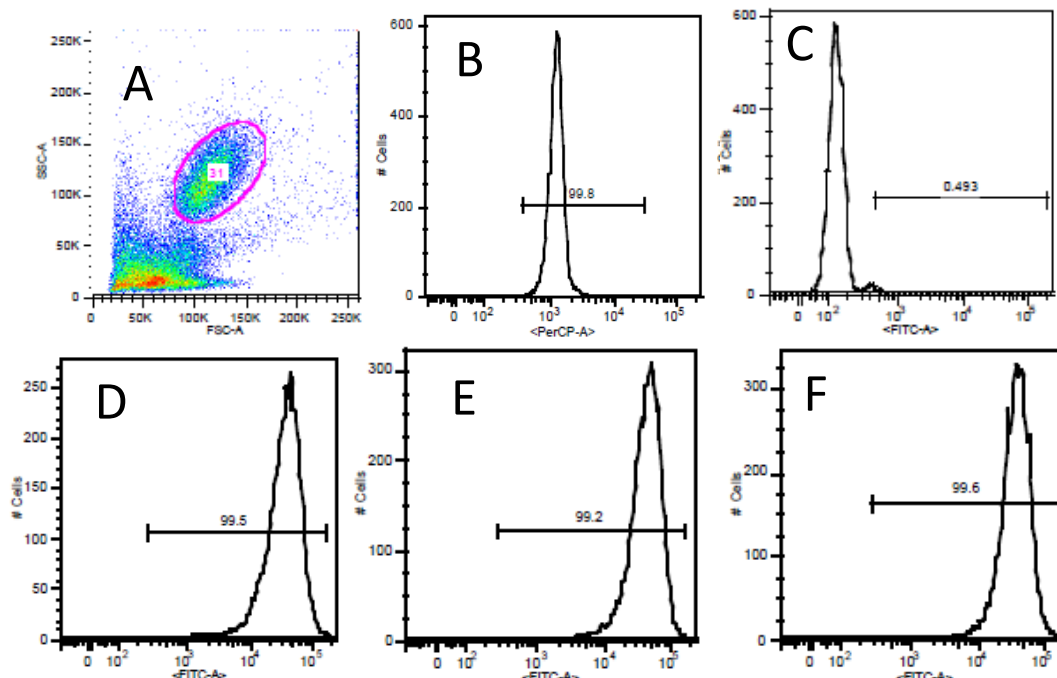


Figura 3.1- Avaliação da capacidade fagocítica de neutrófilos por citometria de fluxo. (A) Definição do *gate* sobre a população de neutrófilos no DotBlot de FSC por SSC. (B) Histograma do canal PerCp que permitiu a identificação das células positivamente marcadas com anticorpo anti-CD16 humano-PerCp. (C) Análise de Fluorescência em FITC numa amostra a 4°C. (D), (E) e (F) Representam respectivamente exemplos da análise de detecção de fluorescência em FITC para amostras Controlo, CIR e NASH.

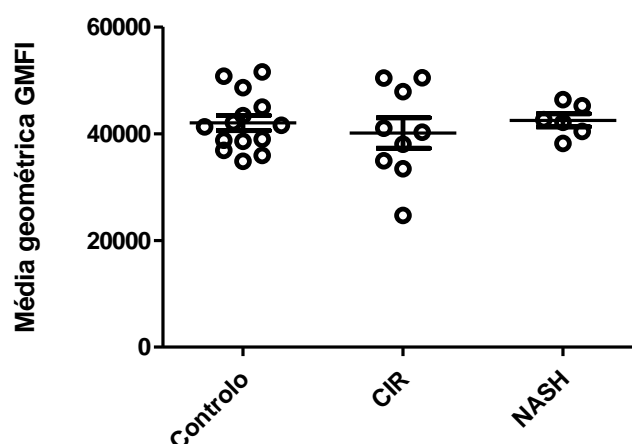


Figura 3.2- Capacidade fagocítica de neutrófilos nos diferentes grupos experimentais. Indicação dos valores médios da intensidade de fluorescência obtida em FITC para cada grupo em análise, os quais são directamente proporcionais ao número de bactérias fagocitadas pelos neutrófilos.

3.3 Explosão Oxidativa

Nos ensaios de explosão oxidativa foi estudada a capacidade de produção de ROS por neutrófilos numa condição basal assim como em função da estimulação com fMLP ou PMA, de acordo com o protocolo descrito na secção de Materiais e Métodos. Por citometria de fluxo, avaliou-se a intensidade de fluorescência devido à oxidação de DHR 123 (medida no canal FITC) em neutrófilos identificados pela marcação com o anticorpo anti-CD16 humano-PerCP. Cada amostra foi analisada em triplicado.

A partir das representações gráficas do tipo DotBlot, foi determinada para cada triplicado a percentagem de neutrófilos com capacidade de produzir ROS. Com estes valores, determinou-se numa fase inicial para cada amostra a média das percentagens obtidas nos triplicados analisados. Posteriormente, calculou-se para cada grupo experimental a média das percentagens obtidas e o erro associado.

3.3.1 Condição Basal

Os níveis de produção basal de ROS nos grupos analisados foram medidos nas amostras que só continham DHR 123. Desta forma, foi possível avaliar o estado de activação dos neutrófilos antes da adição dos estimuladores, medindo a respectiva percentagem de células no canal FITC. Na figura 3.3 encontram-se representados exemplos da análise efectuada nesta condição nos vários grupos experimentais.

Com base nestes dados, foram calculados para todas as amostras incluídas nos 3 grupos as médias de percentagem de neutrófilos produtores de ROS em repouso, utilizando para tal os valores determinados para os triplicados efectuados. Os resultados obtidos estão representados graficamente na figura 3.4 e foram de : $16,41 \pm 2,85$ para Controlos; $24,13 \pm 4,69$ para doentes CIR; $17,35 \pm 1,52$ para doentes NASH. A análise estatística não revelou a existência de diferenças significativas entre os grupos.

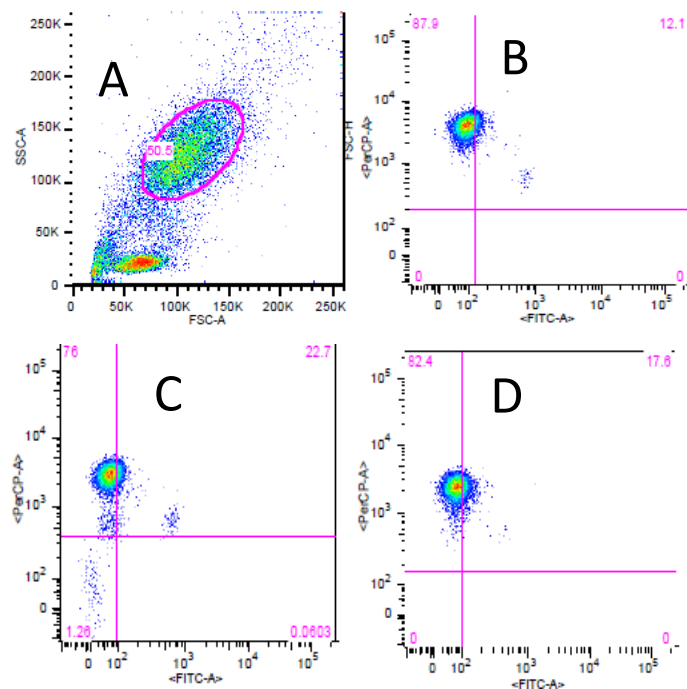


Figura 3.3- Análise por citometria de fluxo da explosão oxidativa basal de neutrófilos. (A) Definição de um *gate* sobre a população de neutrófilos comum aos diversos grupos analisados. (B), (C), (D) Medição do sinal em FITC respeitante à produção endógena de ROS em condições basais em amostras Controlo, CIR e NASH, respectivamente.

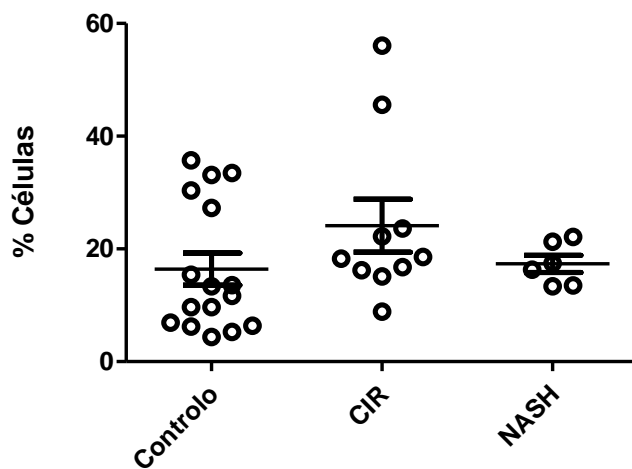


Figura 3.4 – Produção basal de ROS em neutrófilos não estimulados. Representação gráfica dos valores médios de percentagens de neutrófilos produtores de ROS na condição basal.

3.3.2 Estimulação com fMLP

Na figura 3.5 estão representados exemplos ilustrativos da análise por citometria de fluxo da explosão oxidativa de neutrófilos após estimulação com fMLP para diferentes amostras dos grupos estudados.

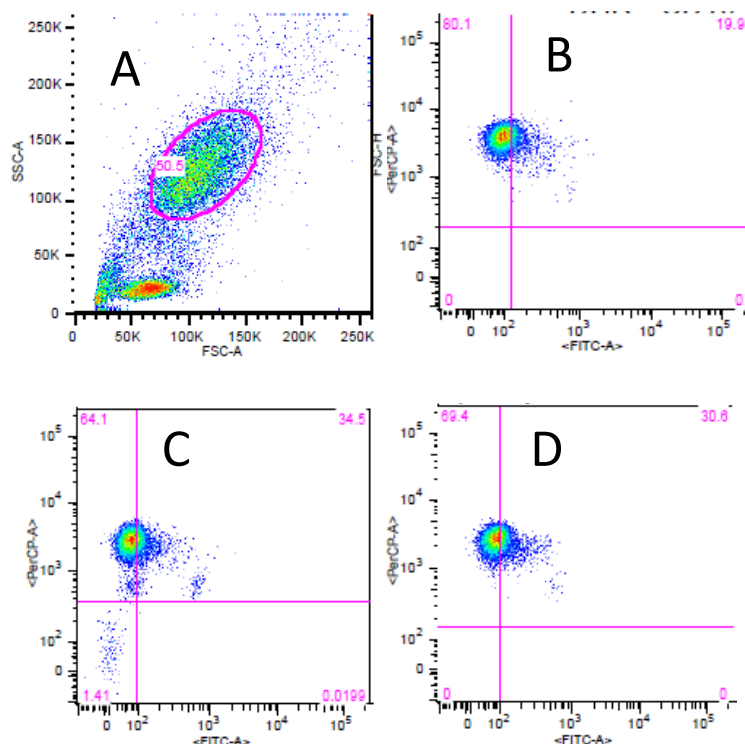


Figura 3.5- Análise por citometria de fluxo da explosão oxidativa de neutrófilos mediante estimulação com fMLP. (A) Definição de um *gate* sobre a população de neutrófilos comum aos diversos grupos analisados. (B), (C), (D) Medição do sinal em FITC respeitante à produção endógena de ROS após estimulação com fMLP em amostras Controlo, CIR e NASH, respectivamente

Com base nesta análise, determinou-se por amostra a média de percentagem de neutrófilos produtores de ROS nos triplicados efectuados. Os resultados obtidos estão representados graficamente na figura 3.6, que permite avaliar comparativamente a capacidade de produção de ROS de neutrófilos após estimulação com fMLP nos diferentes grupos experimentais. Com estes dados, obtiveram-se as seguintes médias de percentagens de neutrófilos com capacidade de produção de ROS para cada grupo experimental: $23,89 \pm 2,65$ para o grupo Controlo; $34,34 \pm 6,42$ para grupo de doentes CIR e $29,18 \pm 1,97$ para grupo de pacientes com NASH. Estatisticamente não se observaram diferenças significativas entre qualquer dos grupos em análise.

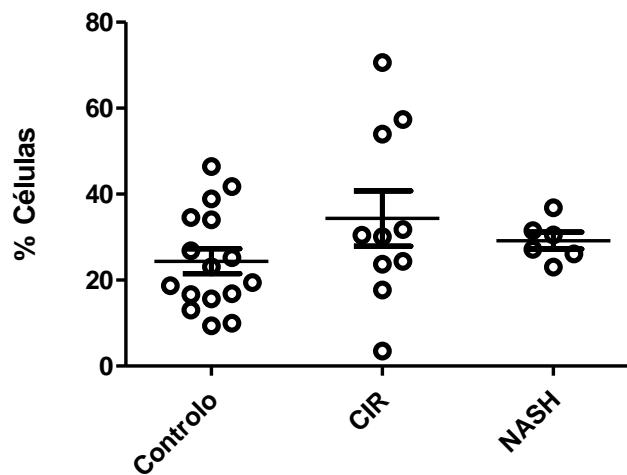


Figura 3.6- Produção de ROS em neutrófilos estimulados com fMLP. Representação gráfica dos valores médios de percentagens de neutrófilos produtores de ROS após estimulação com fMLP para cada grupo experimental.

3.3.3 Estimulação com PMA

A figura 3.7 ilustra exemplos da análise por citometria de fluxo da explosão oxidativa de neutrófilos estimulados com PMA para amostras dos diferentes grupos experimentais.

Com base nesta análise, determinou-se por amostra a média de percentagem de neutrófilos produtores de ROS nos triplicados efectuados. Os resultados obtidos estão representados graficamente na figura 3.8, que permite avaliar comparativamente a capacidade de produção de ROS em neutrófilos após estimulação com PMA nos diferentes grupos experimentais. Com estes dados, obtiveram-se as seguintes médias de percentagens de neutrófilos produtores de ROS para cada grupo experimental: $98,8 \pm 0,49$ para o grupo Controlo; $98,39 \pm 1,14$ para grupo de doentes CIR e $97,31 \pm 2,20$ para grupo de pacientes com NASH. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos.

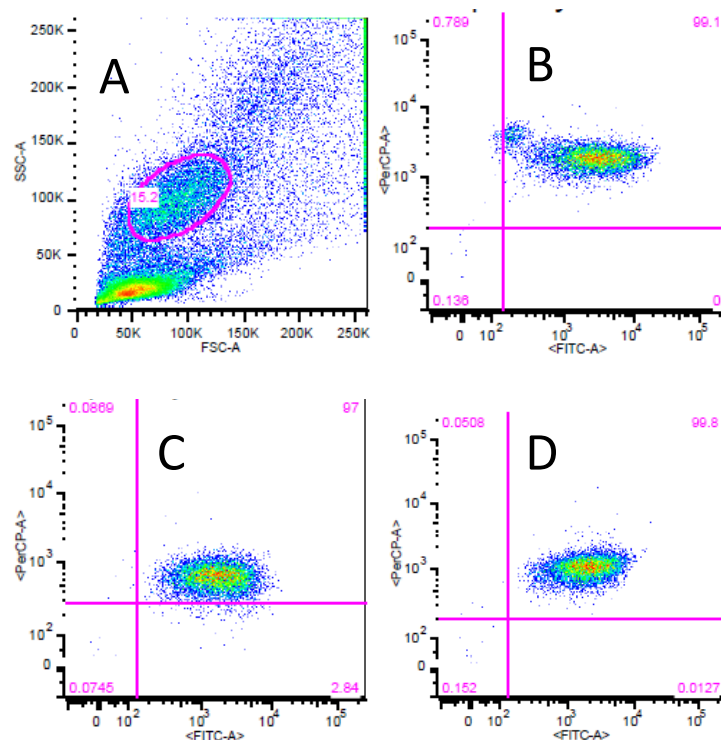


Figura 3.7- Análise por citometria de fluxo da explosão oxidativa de neutrófilos mediante estimulação com PMA. (A) Definição de um *gate* na população de neutrófilos no gráfico FSC por SSC. (B), (C) e (D) Medição do sinal em FITC respeitante à produção endógena de ROS numa amostra Controlo, num doente CIR, e num doente NASH, respectivamente.

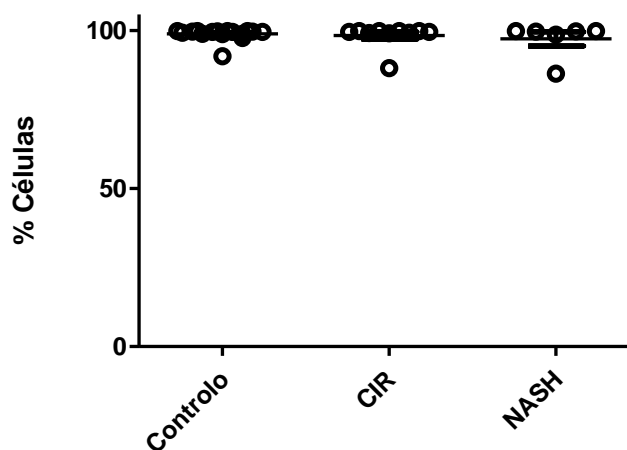


Figura 3.8- Produção de ROS em neutrófilos estimulados com PMA. Representação gráfica dos valores médios de percentagens de neutrófilos produtores de ROS após estimulação com PMA para cada grupo experimental.

3.3.4 Apresentação global de resultados de explosão oxidativa

De forma a simplificar a apresentação e discussão dos dados, é também apresentada de seguida a figura 3.9 que congrega os dados referentes à produção de ROS na condição basal e após estimulação com fMLP e PMA, para cada grupo experimental.

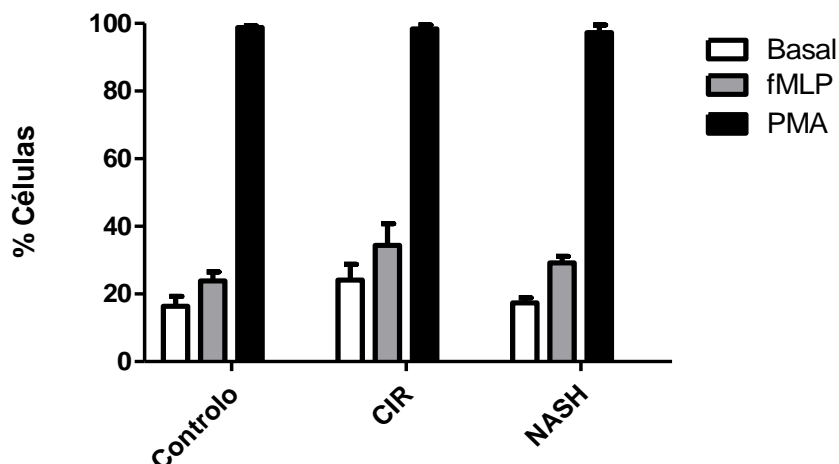


Figura 3.9- Produção de ROS em neutrófilos nas diferentes condições experimentais. A figura representa a percentagem de neutrófilos produtores de ROS na condição basal (barra branca) e após estímulos com fMLP (barra cinzenta) e PMA (barra preta), para os vários grupos experimentais.

3.4 Expressão de marcadores de superfície de neutrófilos

A caracterização funcional dos neutrófilos nas patologias em estudo foi complementada com a realização de ensaios de caracterização fenotípica por citometria de fluxo. Para tal, determinou-se a expressão de um conjunto de receptores de superfície em neutrófilos em amostras de sangue total. Nos ensaios seguintes foram avaliadas as expressões das moléculas CD66b, CD62L e CD11b, utilizando para tal anticorpos específicos marcados com diferentes fluorocromos. Para CD11b, foram utilizados dois anticorpos: o anti-CD11b humano-PE, que reconhece a totalidade de CD11b expresso na membrana celular dos neutrófilos e o anti-CD11b act humano-APC, que reconhece apenas a fracção activada de CD11b.

Recorrendo à conjugação das marcações utilizadas obteve-se por citometria de fluxo, para a mesma população de neutrófilos, dois conjuntos de dados: resultados referentes à marcação dupla CD66b/CD62L e resultados que dizem respeito à marcação CD11b /CD11b act. A avaliação dos gráficos

DotBlot resultantes permitiu obter dados relativos às percentagens de células duplamente positivas e à expressão associada aos diferentes marcadores. Os dados de expressão são apresentados de seguida para as diferentes amostras nos três grupos experimentais utilizados.

3.4.1 Marcação CD66b/CD62L

Após a identificação da população de neutrófilos no DotBlot de FSC por SSC, foi analisada a percentagem de células que apresentam dupla marcação para estas moléculas através dos gráficos DotBlot de CD66b-FITC por CD62L-PerCp. A figura 3.10 exemplifica a análise subsequentemente efectuada, apresentando um exemplo do gráfico obtido para cada grupo experimental.

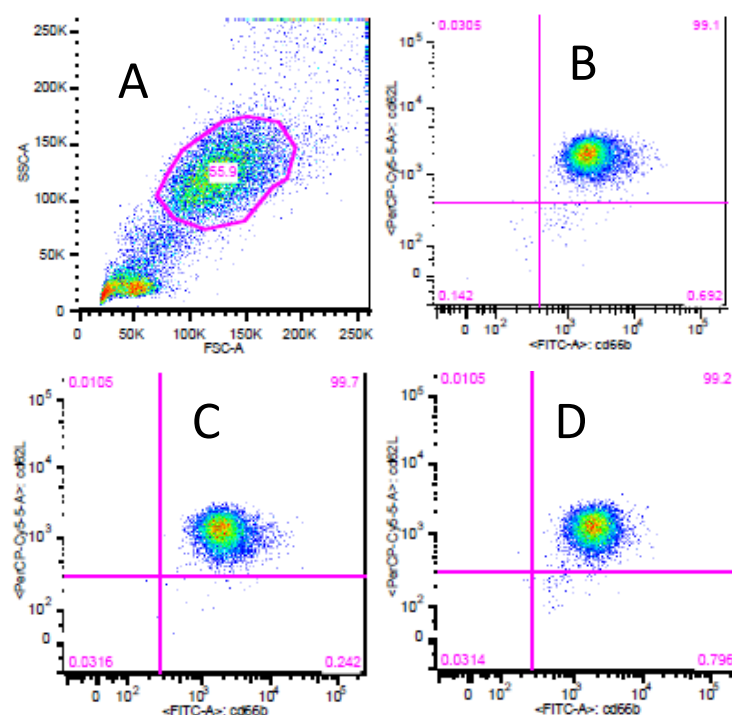


Figura 3.10- Expressão dos marcadores CD66b e CD62L em neutrófilos (A) Identificação da população de neutrófilos em DotBlot de FSC por SSC. (B), (C) e (D) Exemplos dos gráficos de DotBlot CD62L-PerCp/CD66b-FITC para o grupo Controlo, CIR e NASH, respectivamente.

A partir desta análise obtiveram-se as percentagens de células duplamente positivas para as diferentes amostras, as quais se representam graficamente na figura 3.11. Para cada grupo experimental determinaram-se posteriormente os valores médios: $99,04 \pm 0,24$ para Controlos; $99,08 \pm 0,48$ para CIR e $98,23 \pm 1,29$ para NASH. Estes dados não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si.

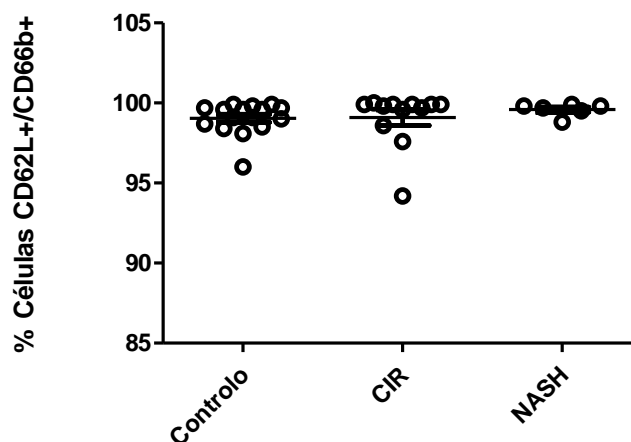


Figura 3.11- Percentagem de neutrófilos CD62L+/CD66B+. Para cada grupo experimental é indicado o valor de percentagens de neutrófilos que apresenta expressão simultânea dos dois marcadores a partir da dupla marcação CD62L-PerCP/ CD66b-FITC.

A partir da análise exemplificada na figura 3.10, determinaram-se ainda os níveis de expressão de CD62L e de CD66b em neutrófilos, sabendo que a intensidade de fluorescência observada para uma dada marcação é proporcional à expressão celular do marcador. Esta análise de expressão foi efectuada com base nos valores das medianas associadas aos canais PerCP e FITC, respectivamente para a marcação com CD62L e de CD66b.

Na figura 3.12, são representados os valores relativos à expressão de CD66b nas diferentes amostras. Com estes valores, determinaram-se ainda valores médios registados para cada grupo experimental: 2148,19 ± 112,06 para o grupo Controlo, de 2089,92 ± 126,24 para o grupo CIR e de 2213,67 ± 125,13 para o grupo NASH. Não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos experimentais.

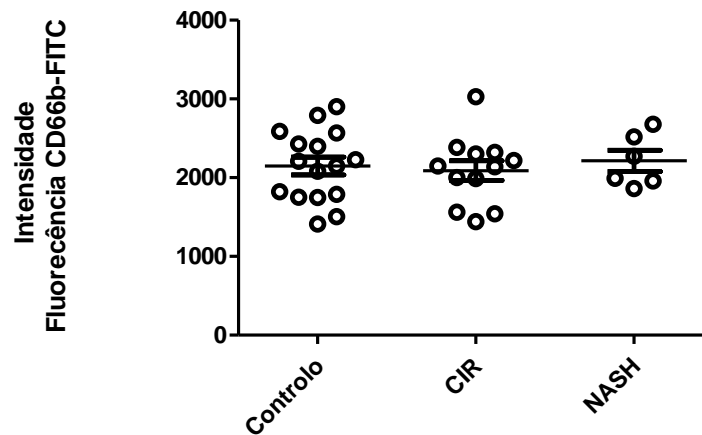


Figura 3.12- Expressão de CD66b em neutrófilos dos diferentes grupos experimentais. A expressão de CD66b foi avaliada a partir do cálculo da mediana da intensidade média de fluorescência determinada para cada amostra nos diferentes grupos experimentais.

Por outro lado, a figura 3.13 ilustra a análise de expressão de CD62L efectuada de forma similar. Para esta marcação obtiveram-se ainda os seguintes valores médios: 2013,86 \pm 154,95 para Controlos, 2059,25 \pm 425,33 para doentes CIR e 1070,2 \pm 130,36 para doentes NASH. Em relação a estes resultados, é de salientar a diminuição estatisticamente significativa da expressão de CD62L em doentes NASH face ao grupo controlo ($P < 0.05$).

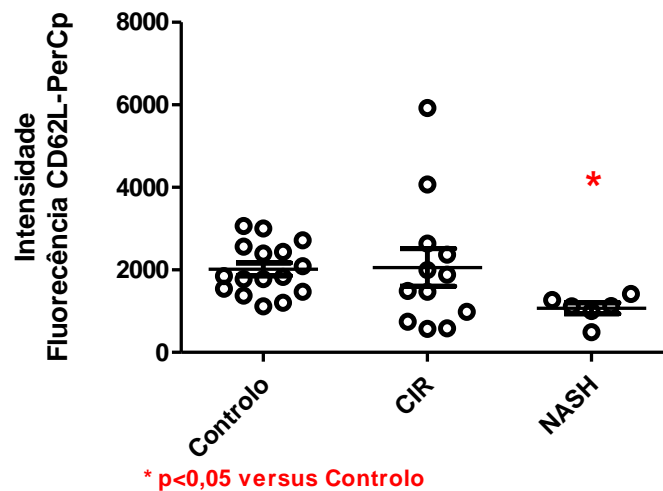


Figura 3.13- Expressão de CD62L em neutrófilos dos diferentes grupos experimentais. A expressão de CD62L foi avaliada a partir do cálculo da mediana da intensidade média de fluorescência determinada para cada amostra nos diferentes grupos experimentais.

3.4.2 Marcação CD11b/CD11b act

Para a análise desta marcação, seguiu-se o procedimento já descrito anteriormente para a marcação CD62L/CD66b, com a diferença de que os gráficos de DotBlot analisados dizem respeito às marcações com os anticorpos anti-CD11b humano-PE, e por anti-CD11b act humano-APC. A título de exemplo, é apresentado na figura 3.14 um ensaio referente a cada um dos diferentes grupos experimentais.

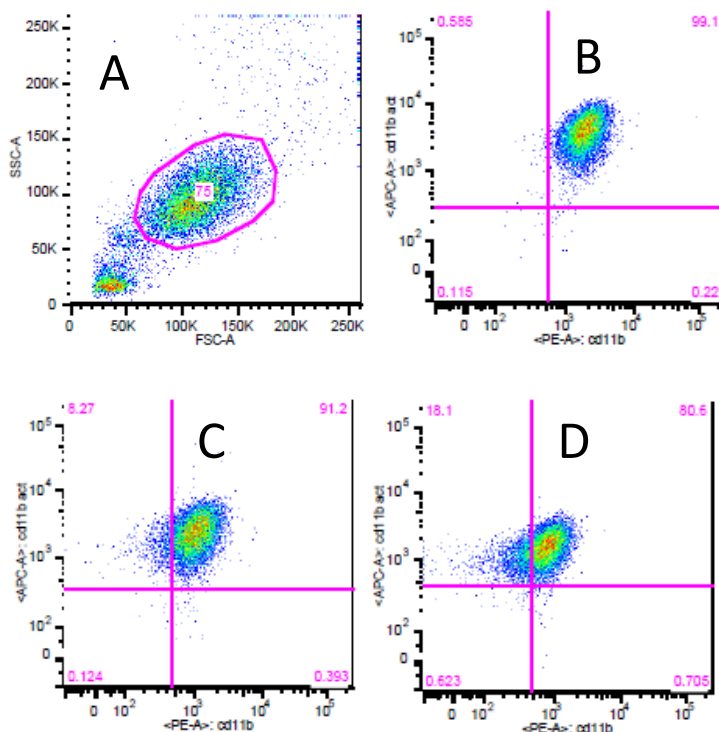


Figura 3.14- Expressão de CD11b total e activado em neutrófilos. (A) Identificação da população de neutrófilos através de um *gate* em DotBlot de FSC por SSC. (B), (C) e (D) Exemplos dos gráficos de Dotblot CD11b-PE/CD11b act-APC para indivíduos dos grupos Controlo, CIR e NASH, respectivamente.

A partir destas representações gráficas, determinou-se a percentagem de população de neutrófilos duplamente positivas para CD11b e CD11b act e calcularam-se os valores percentuais médios para cada grupo: $96,31 \pm 0,62$ para Controlos; $90,8 \pm 1,95$ para o grupo CIR; $81,9 \pm 5,36$ para doentes NASH. Estes valores estão apresentados graficamente na figura 3.15. A análise estatística destes resultados revelou que ambos os grupos de doentes apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em comparação com o grupo Controlo.

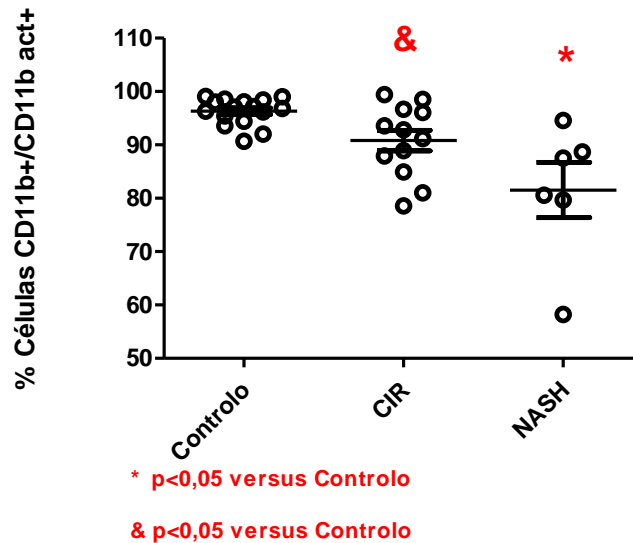


Figura 3.15-Percentagem de neutrófilos CD11b⁺/CD11b act⁺. Para cada grupo experimental é indicado o valor de percentagens de neutrófilos que apresenta expressão simultânea dos dois marcadores a partir da dupla marcação CD11b-PE/CD11b act-APC

A partir da análise esquematizada na figura 3.14 foi também possível avaliar-se a expressão membranar de CD11b total e de CD11b activado em neutrófilos através da determinação dos valores das medianas de intensidade de fluorescência obtidos respectivamente nos canais PE e APC para cada amostra. Em relação à marcação com CD11b total, obtiveram-se os seguintes valores médios para cada grupo experimental: $1520,69 \pm 99,75$ para Controlos; $1357,5 \pm 134,65$ para doentes CIR e; $982,66 \pm 124,78$ para o grupo NASH. Estes dados são apresentados na figura 3.16 e registou-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre valores de doentes NASH e os do grupo Controlo.

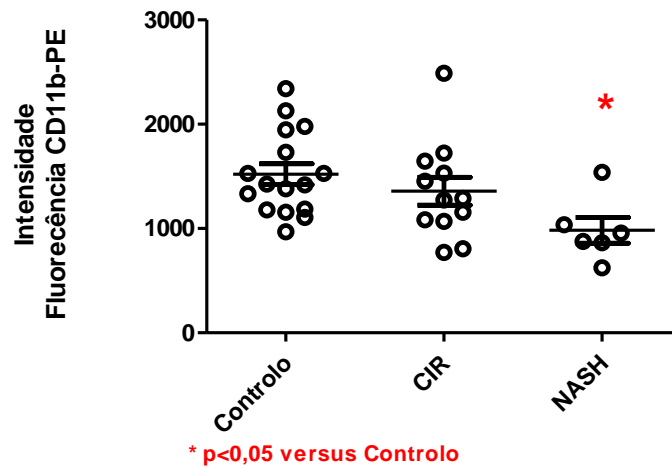


Figura 3.16- Expressão de CD11b total em neutrófilos dos diferentes grupos experimentais. A expressão de CD11b total foi avaliada a partir do cálculo da mediana da intensidade média de fluorescência determinada para cada amostra nos diferentes grupos experimentais.

No que respeita à marcação de CD11b activado, os dados obtidos para as diferentes amostras nos diversos grupos estudados estão representados na figura 3.17. Para cada grupo experimental obtiveram-se os seguintes valores: $2179,69 \pm 208,22$ para o grupo Controlo; $2109,17 \pm 494,18$ para doentes CIR; $1096 \pm 161,29$ para doentes NASH. São de salientar as diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre o grupo NASH e o grupo Controlo.

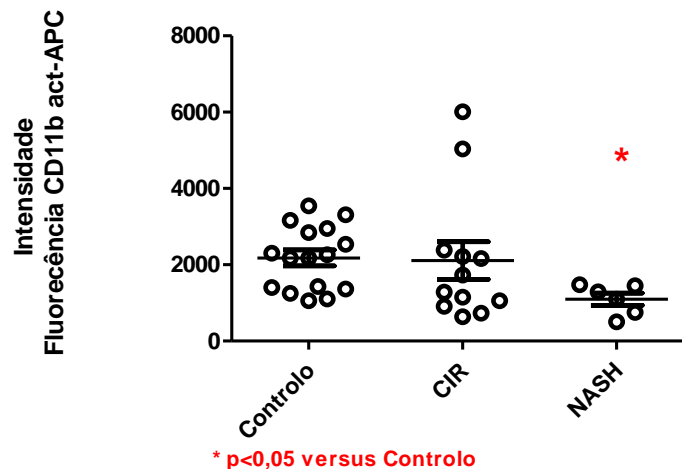


Figura 3.17- Expressão de CD11b activado em neutrófilos dos diferentes grupos experimentais. A expressão de CD11b activado foi avaliada a partir do cálculo da mediana da intensidade média de fluorescência determinada para cada amostra nos diferentes grupos experimentais.

Para se obter uma evidência mais precisa da ativação de CD11b na superfície membranar dos neutrófilos, procedeu-se ainda ao cálculo da razão entre as medianas das intensidades médias de fluorescência determinadas para CD11b total-PE e CD11b ativado-APC para cada amostra. Estes resultados são apresentados na figura 3.18, sendo que os valores médios da razão CD11b ativado/CD11b total obtidos para cada grupo experimental foram de: $1,46 \pm 0,14$ para o grupo Controlo; $1,45 \pm 0,23$ para doentes CIR e; $1,14 \pm 0,16$ para doentes NASH.

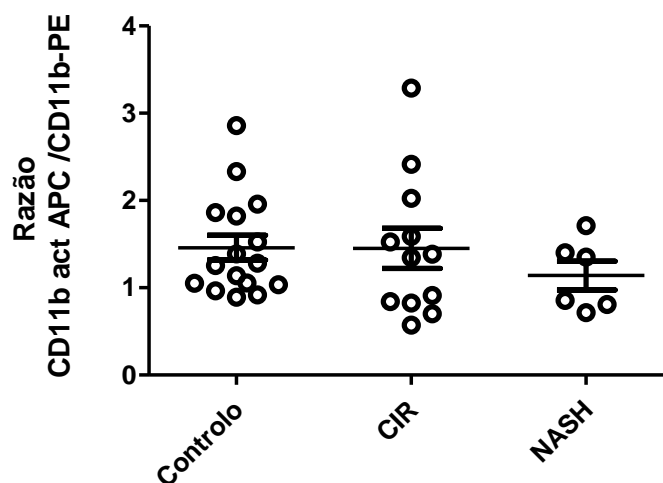


Figura 3.18. Razão CD11b ativado/CD11b total. Esta razão foi determinada com base nos valores de medianas das intensidades médias de fluorescência determinadas para CD11b total-PE e CD11b ativado-APC para cada amostra.

4. Discussão

4.1 Discussão Geral

As doenças hepáticas de origem alcoólica e não alcoólica, apesar de serem desencadeadas por causas distintas, desenvolvem-se de forma semelhante (Labor *et al*, 2007). Entre outras características em comum, estas patologias caracterizam-se pela presença de um infiltrado de neutrófilos no tecido hepático (Yeh e Brunt, 2007; Ramadori *et al*, 2008). Neste contexto, destacam-se alguns estudos que apontam para a existência de uma disfunção nos neutrófilos em pacientes com cirrose sobreposta a esteato-hepatite alcoólica (Mokerjee *et al*, 2007; Tritto *et al*, 2011) e em doentes com cirrose avançada (Panasiuk *et al*, 2005). Com base nestes dados, pretendia-se nesta tese perceber se os neutrófilos de doentes com esteato-hepatite não alcoólica sem diagnóstico comprovado de cirrose exibem ou não um padrão disfuncional semelhante.

De forma a responder a esta questão, procedeu-se no presente trabalho à avaliação funcional de neutrófilos em 3 grupos experimentais distintos: um grupo controlo composto por indivíduos saudáveis, um grupo de doentes com esteato-hepatite não alcoólica sem prognóstico clínico de cirrose e ainda um grupo de doentes com cirrose alcoólica compensada. Como crítica inicial ao trabalho, é importante referir a baixa amostragem de doentes incluídos no estudo ($n = 6$, para doentes NASH; $n = 12$ para doentes CIR). Assim, qualquer inferência resultante sobre o estado de activação de neutrófilos nas patologias estudadas deve ser interpretada apenas como uma tendência da (baixa) população analisada e nunca como o comportamento geral observado nos casos clínicos.

A caracterização funcional dos neutrófilos incidiu na avaliação da capacidade fagocítica, da explosão oxidativa e na expressão de marcadores de activação celular. Todos estes estudos foram realizados com recurso à utilização da citometria de fluxo que oferece a vantagem de permitir a utilização de um reduzido volume de sangue (foram utilizados 100 μ l por ensaio em cada protocolo) e assim de evitar as perturbações inerentes a passos de isolamento e purificação de neutrófilos (Eeden, 1999).

Os neutrófilos fazem parte das células do sistema imune inato e têm elevada mobilidade na resposta a infecções ou lesões nos tecidos. A principal função dos neutrófilos ao serem recrutados para locais inflamatórios é a de eliminar rapidamente microrganismos invasores através da sua capacidade em gerar agente citotóxicos (Jaeschke, 2006). Os processos de fagocitose e de explosão oxidativa são essenciais neste contexto e são indicadores do grau de activação dos neutrófilos em determinado momento.

Em relação à função fagocítica de neutrófilos, não se observaram no presente estudo variações estatisticamente significativas entre os três grupos experimentais utilizados (figura 3.2). Estes dados

sugerem portanto que estes leucócitos apresentam semelhante capacidade de fagocitose nos três grupos experimentais estudados. Os dados evidenciam um ligeiro decréscimo da capacidade fagocítica em doentes com cirrose compensada (grupo CIR) face ao grupo controlo. Esta última observação vai de encontro aos dados obtidos anteriormente por Mokerjee *et al* em 2007 num estudo similar com doentes com cirrose alcoólica.

De igual forma, não se registaram quaisquer variações estatisticamente significativas entre grupos nas diferentes condições testadas (em repouso e mediante estimulação por fMLP e PMA) nos ensaios de explosão oxidativa. O ensaio de explosão oxidativa em repouso permite determinar o potencial de produção de ROS na ausência de estimulação exógena da população de neutrófilos. No presente estudo, observou-se que os neutrófilos dos grupos de doentes apresentaram níveis de explosão oxidativa basais ligeiramente superiores ao grupo Controlo, sendo que esse aumento é mais notório em pacientes com cirrose compensada do que em pacientes NASH (figura 3.4). Nestas condições, uma população quiescente não deverá apresentar uma explosão oxidativa significativa e, quanto mais activada a população se encontrar, maior será a capacidade de produção de ROS esperada. Assim, pelos resultados obtidos, os neutrófilos do grupo de doentes cirróticos parecem estar na condição basal mais activados que os dos restantes grupos.

O PMA constitui um potente activador de neutrófilos, uma vez que induz de imediato alterações no complexo enzimático da NADPH oxidase levando à produção de ROS (Bruce *et al*, 1991). Neste cenário, seria de esperar uma activação generalizada, caracterizada pela produção de ROS, independentemente da população se encontrar em quiescência ou num estado mais activado. Os resultados obtidos (figura 3.8), comprovam o esperado, uma vez que em todos os grupos estudados a percentagem de neutrófilos que produzem ROS é quase máxima.

Em comparação com os efeitos do PMA, o fMLP é um activador menos potente, que desperta oxidação mínima em neutrófilos não estimulados, sendo que o seu efeito é potenciado em neutrófilos que já se encontrem pré-activados (Mokerjee *et al*, 2007). Os resultados obtidos com fMLP (figura 3.6) apontaram para um ligeiro aumento na produção de ROS em neutrófilos de doentes em comparação com os valores controlo. À semelhança da explosão oxidativa basal, foram os pacientes com cirrose compensada que apresentaram valores superiores na produção de ROS.

Num cômputo geral, os resultados dos ensaios de explosão oxidativa (figura 3.9) mostraram uma tendência dos neutrófilos de pacientes com cirrose compensada se encontrarem mais activados que os do grupo Controlo, apesar da não significância estatística dos resultados obtidos. Isto porque apresentaram maior produção de ROS na condição basal e após estimulação com fMLP. Estes dados vão ao encontro aos apresentados em estudos anteriores, que concluíram que os neutrófilos em sangue periférico de doentes cirróticos apresentam uma disfunção caracterizada por uma maior produção de ROS em

circulação (Mokerjee *et al*, 2007; Tritto *et al*, 2011). Pensa-se que esta pré-activação dos neutrófilos nas doenças hepáticas de origem alcoólica esteja relacionada com o aumento dos níveis de endotoxina em circulação devido ao concomitante aumento da permeabilidade da parede intestinal (Fiuza *et al*, 2000; Labor *et al*, 2007). A pré-activação de neutrófilos, associada à sua presença histológica no tecido hepático poderá contribuir para o desenvolvimento de lesões hepáticas através de stress oxidativo (Ramaiah e Jaeschke, 2007; Jaeschke, 2006). Em relação aos doentes NASH, apesar da explosão oxidativa dos seus neutrófilos na condição basal se encontrar mais próxima dos valores do grupo Controlo, a estimulação com fMLP permitiu evidenciar um perfil de activação semelhante ao dos pacientes com cirrose compensada. No seu conjunto, estes resultados não permitem inferir com fiabilidade sobre o estado de activação dos neutrófilos na doença hepática não alcoólica.

A análise funcional efectuada para os três grupos experimentais utilizados incluiu ainda um estudo da expressão de marcadores específicos, a saber: CD66b, CD62L e CD11b. Com anticorpos específicos para estes marcadores foi possível para cada amostra caracterizar-se a população de neutrófilos através das seguintes marcações duplas CD66b/CD62L e CD11b/CD11b act.

Para a primeira marcação, não se registaram diferenças significativas entre os grupos incluídos no estudo no que respeita à percentagem de neutrófilos com marcação positiva para ambas as moléculas ou mesmo quanto à expressão membranar individual de CD66b. Este marcador corresponde a uma glicoproteína que tem sido utilizada como marcador específico de neutrófilos (Vidal *et al*, 2012). Por outro lado, é também empregue como marcador de activação destes leucócitos, dado a sua expressão na membrana celular poder aumentar mediante activação daqueles (Elghetany, 2002). Desta forma, os resultados referentes à expressão individual de CD66b (figura 3.12) parecem indicar que os neutrófilos de ambas as patologias se deverão encontrar num estado quiescente semelhante ao do grupo controlo.

Conforme referido na revisão teórica, o CD62L e o CD11b são dois factores activamente intervenientes na cascata de adesão de neutrófilos, cujas expressões são alteradas durante o processo de recrutamento, bem como durante a activação de neutrófilos. O CD62L é eliminado da superfície celular por digestão enzimática durante o processo de activação do neutrófilo (Oommen *et al*, 2003). Em relação ao CD11b, tanto a sua expressão como a sua activação são moduladas na resposta inflamatória. Esta integrina pode ser encontrada em pelo menos dois estados funcionais: num estado inactivado e num estado activado. Neste último, ocorrem alterações conformacionais que permitem a exposição de sequências peptídicas funcionalmente relevantes (Orr *et al*, 2007). Durante o processo inflamatório, vários estímulos podem induzir estas alterações contribuindo assim para um aumento relativo de CD11b activado. Por outro lado, a expressão celular de CD11b é também modulada na resposta inflamatória. Neste contexto, a expressão membranar de CD11b em neutrófilos em circulação é aumentada durante o processo inflamatório (por exemplo, em resposta a uma endotoxemia) (Jaeschke, 2006; Menezes *et al*,

2009). Devido a estas razões, estes dois factores constituem dois importantes marcadores no estudo de activação de neutrófilos.

No presente estudo, e a partir da análise dos resultados obtidos na marcação dupla CD66b/CD62L, observou-se, por um lado, que a expressão de CD62L na membrana de neutrófilos de doentes CIR é em média ligeiramente superior à do grupo Controlo (figura 3.13). Por outro lado, observou-se de forma mais acentuada um decréscimo na expressão membranar de CD62L no grupo de doentes NASH. Pese embora a baixa amostragem de doentes neste grupo, este resultado é estatisticamente significativo ($p < 0,05$), o que sugere que nestes doentes, os neutrófilos em circulação poderão já apresentar algumas características típicas de um estado activado nesta patologia.

Em relação à marcação CD11b/CD11b act, os resultados obtidos neste trabalho indicaram uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da percentagem de neutrófilos CD11b+/CD11b act+ tanto em doentes CIR como em doentes NASH face à população controlo (figura 3.15), apesar da baixa amostragem de doentes. Numa análise paralela aos gráficos DotBlot respeitantes a esta dupla marcação para as diversas amostras dos vários grupos experimentais, observou-se uma tendência para que a população de neutrófilos dos grupos patológicos entre no quadrante correspondente à zona de expressão negativa para CD11b act, aproximando-se do limar da marcação CD11b (exemplo desta análise na figura 3.14). De facto, quando se analisaram estas marcações individualmente, constatou-se uma diminuição da expressão total de CD11b assim como da sua forma activa em ambos os grupos de doentes face ao grupo Controlo. No que concerne à expressão total de CD11b na membrana celular de neutrófilos, observou-se o seu decréscimo em média para doentes CIR e doentes NASH em relação aos controlos (figura 3.16). Este decréscimo é estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para doentes NASH. Consistentemente observou-se também uma diminuição da expressão membranar da forma activada de CD11b em ambos os grupos ASH e NASH face ao grupo controlo (figura 3.17), sendo que apenas o resultado respeitante ao grupo NASH apresentou significância estatística ($p < 0,05$).

Por forma a perceber se estes resultados se deveriam exclusivamente a uma diminuição da expressão celular de CD11b ou dever-se ainda à alteração do seu estado de activação, procedeu-se à análise da razão de sinal detectado para estes dois marcadores. Conforme visível na figura 3.18 verificou-se que a razão CD11b act/CD11b tem tendência a ser mais baixa em doentes NASH e com cirrose alcoólica que em controlos, sendo menor no primeiro grupo. Estes resultados, embora sugiram uma menor activação de CD11b nos grupos de doentes não são estatisticamente significativos.

4.2 Conclusões

Apesar da baixa amostragem de doentes no estudo e da ausência de resultados com significância estatística em várias das análises funcionais efectuadas, observaram-se no entanto um conjunto de resultados que permitem sugerir diferenças funcionais nos neutrófilos de doentes com esteato-hepatite não alcoólica em relação às mesmas células de indivíduos saudáveis.

Neste estudo, os doentes com cirrose alcoólica compensada não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação a nenhum outro grupo experimental quanto à capacidade fagocítica, à explosão oxidativa e à expressão membranar de CD62L, CD66b e CD11b.

Em doentes com esteato-hepatite não alcoólica também não se registaram diferenças significativas ao nível da capacidade fagocítica e da explosão oxidativa. Neste grupo de doentes registaram-se todavia diminuições na expressão membranar de CD62L, CD11b e CD11b activado, com significância estatística ($p < 0,05$). Ainda que os resultados obtidos para outros parâmetros de activação celular não o evidenciem, estas variações de expressão dos marcadores CD62L e CD11b sugerem uma tendência para que os neutrófilos na circulação sanguínea periférica possam apresentar nesta doença uma função alterada que poderá mesmo influenciar a sua progressão clínica.

4.3 Perspectivas Futuras

É mais uma vez importante ressaltar que a amostragem de doentes incluídos nesta tese foi bastante baixa ($n = 6$, para doentes NASH; $n = 12$ para doentes CIR). Será então necessário aumentar o número de pacientes utilizados no estudo, para que se obtenham resultados estatisticamente mais significativos.

Paralelamente, será também importante incluir na experiência doentes hepáticos com estados de doença e características diferentes dos pacientes já analisados. Por exemplo, a análise sairia enriquecida se fossem estudados pacientes com: hepatite alcoólica sobreposta a cirrose, e com esteato-hepatite não alcoólica sobreposta a cirrose. Neste âmbito seria possível tirar conclusões para várias etapas da patologia hepática.

Outro aspecto importante que poderá complementar as análises realizadas seria o de medir os níveis plasmáticos de endotoxina plasmática nos doentes com NASH. Desta forma, poder-se-ia elucidar se a aparente disfunção detectada nos neutrófilos, nomeadamente a menor expressão tendencial de CD62L, neste grupo experimental está ou não correlacionada com um aumento dos níveis de endotoxina, que sabe-se estar envolvida em disfunções neutrófilicas em doenças hepáticas alcoólicas (Menezes *et al*, 2009, Mokerjee *et al*, 2007; Tritto *et al*, 2011). Depois de num futuro próximo serem tomadas as acções referidas anteriormente, a médio prazo os estudos sobre o estado de activação e função dos neutrófilos

serão beneficiados se complementarmente for também abordada a expressão de marcadores de apoptose e a capacidade de produção de NET's.

O derradeiro objectivo ao estudar os neutrófilos nas esteato-hepatites alcoólica e não alcoólica será sempre o de compreender exactamente a sua função nestas patologias hepáticas.

5. Bibliografia

- Adams D, Ju C, Ramaiah S, Uetrecht J, Jaeschke H. 2010. Mechanisms of Immune-Mediated Liver Injury. *Toxicological Sciences* 115: 307-321
- Adams LA, Angulo P. 2006. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J* 82: 315-322
- American Gastroenterological Association, American Association for the study of Liver Diseases. 2002. AGA Technical Review on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 123: 1705-1725
- Angulo, P. 2002. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The New England Journal of Medicine*. 346: 1221-1230
- Anstee QM, McPherson S e Day CP. 2011. How big a problem is non-alcoholic fatty liver disease?. *Clinical Research ed* 343
- Battaller R, Romboust K, Altamirano J e Marra F. 2011. Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25: 231-244
- Bautista AP. 2002. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 27: 17-21
- Bertho A. 2001. Citometria de Fluxo. Sebenta de Citometria de Fluxo. Instituto Oswaldo Cruz. Brasil. picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc
- Biosciences BD. 2000. Introduction to Flow Cytometry: A learning guide. <http://static.abdserotec.com/Lit-pdfs/Brochures1/flowcytometry.pdf>
- Borregaard N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33: 357-370
- Brown M e Wittwer C. 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry* 46: 1221-1229
- Bruce IN, McNally JA, Rea IM, Bell AL. 1997. Age-related changes in non-receptor dependent generation of reactive oxygen species from phagocytes of healthy adults. *Mech Ageing Dev* 94: 135-144.
- Bruha R, Dvorak K, Petryl J. 2012. Alcoholic Liver Disease. *World Journal of Hepatology* 4: 81-90
- Cohen JC, Horton JD e Hobbs HH. 2011. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* 332
- Condliffe AM, Kitchen E e Chilvers ER. 1998. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci* 94: 461-471
- Day CP. 2007. Treatment of Alcoholic Liver Disease. *Liver Transplantation* 13: 69-75
- Dempsey PW, Vaidya SA e Cheng G. 2003. The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci* 60: 2604-2621
- DiBaise JK. 2008. Nutritional Consequences of Small Intestinal Bacterial Overgrowth. *Practical Gastroenterology* 69

Donohue TM Jr. 2007. Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World Journal of Gastroenterology* 13: 4974-4978

Edmison J e McCullough AJ. 2007. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis: human data. *Clin Liver Dis* 11: 75-104

Eeden F, Klut M, Walker B e Hogg J. 1999. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *Journal of Immunological Methods* 232: 23-43

El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo ME e Elbim C. 2005. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp* 53: 199-206

Elghetany MT. 2002. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol Dis* 28: 260-274

European Association For The Study Of The Liver. 2012. EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease. *Journal of Hepatology* 57: 399-420

Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. 2012. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut and Liver* 6: 149-171

Feghali CA, Wright TM. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2: 12-26

Fiuza C, Salcedo M, Clemente G e Tellado JM. 2000. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis* 182: 526-533

Fleit HB. 1991. Monoclonal antibodies to human neutrophil Fc gamma RIII (CD16) identify polypeptide epitopes. *Clin Immunol Immunopathol* 59: 222-235

Glycotope Biotechnology. 2009. Instruções PHAGOTEST™ versão 03/09

Goldsby R, Kindt TJ, Osborne BA e Kuby J. 2003. Immunology. W.H. Freeman

Gramenzi A, Caputo F, Biselli M, Kuria F, Loggi E, Andreone P, Bernardi M. 2006. Review article: alcoholic liver disease--pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther* 24: 1151-1161

Guturu P, Duchini A. 2012. Etiopathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: Role of Obesity, Insulin Resistance and Mechanisms of Hepatotoxicity. *International Journal of Hepatology* 2012

Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, McGee KC, Billyard T, Youssef-Elabd EM, Tripathi G, Ashour E, Abdalla MS, Sharada HM, Amin AI, Burt AD, Kumar S, Day CP, McTernan PG. 2010. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm* 30: 7-15

Hashiguchi N, Chen Y, Rusu C, Hoyt DB e Junger WG. 2005. Whole-Blood Assay to Measure Oxidative Burst and Degranulation of Neutrophils for Monitoring Trauma Patients. *European Journal of Trauma* 31: 379-388

- Jaeschke H. 2006. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: 1083-1088
- Jaeschke, H. e Hasegawa, T. 2006. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver international* 26: 912-919
- Kitchen E, Rossi AG, Condliffe AM, Haslett C e Chilvers ER. 1996. Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood* 88: 4330-4337
- Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, Matsuyama Y, Soeda J, Matsunaga K e Kawasaki S. 2001. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: 577-585
- Kobayashi SD e DeLeo FR. 2009. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1: 309-333
- Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C e DeLeo FR. 2005. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp* 53: 505-517
- Kumar H, Kawai T e Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30: 16-24
- Kumar V, Sharmab A. 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology* 10: 1325-1334
- Labor PF, Faint J, Aarbodem Y, Hubcher S.G e Adams D.H.2007. The Role of Cytokines and Chemokines in the Development of Steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 27: 173-193
- Leber B, Mayrhauser U, Rybczynski M. e Stadlauber,V. 2009. Innate immune dysfunction in acute and chronic liver disease. *The Middle European Journal of Medicine.* 121: 732-744
- Lee UE, Friedman SL. 2011. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25: 195-206
- Lee, Woo-Young. e Kubes, P. 2008. Leukocyte adhesion in the liver: Distinct adhesion paradigm from other organs. *Journal of Hepatology* 48: 504-512
- Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P e Mallat A. 2005. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 605-628
- Luz R. 2004. Sangue e Hematopoiese. Artigo digital disponível em nebm.ist.utl.pt/repositorio/download/990
- Maher J. 1997. Exploring Alcohol's Effects on Liver Functions. *Alcohol Health & Research World* 21: 5-12.
- Marra F, Gastaldelli A, Baroni G, Tell G e Tiribelli, C. 2007. Molecular basics and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in Molecular Medicine* 14 : 72-81

- Marsano LS, Mendez C, Hill D, Barve S e McClain CJ. 2003. Diagnosis and Treatment of Alcoholic Liver Disease and Its Complications. *Alcohol Research & Health* 27: 247-256
- McDonald B e Kubes P. 2011. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *J Mol Med (Berl)* 89: 1079-1088
- Medical Criteria. 2010. Child-Pugh Classification of Severity of Liver Disease. http://www.medicalcriteria.com/criteria/gas_liver.htm
- Menezes GB, Lee WY, Zhou H, Waterhouse CC, Cara DC e Kubes P. 2009. Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. *J Immunol* 183 :7557-7568
- Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP e Grieco A. 2009. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49: 1877-1887
- Mokerjee RP, Stadbauer V, Lidder S, Wright GAK, Hodges SF, Davis N e Jalan, R. 2007. Neutrophil Dysfunction in Alcoholic Hepatitis Superimposed on Cirrhosis is Reversible and Predicts the Outcome. *Hepatology* 46: 831-840
- Nunes, P. e Moreira, A. 2006. Texto de apoio em Fisiologia Hepática. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
- Oommen A, Patel R, Browning M e Grigg J. 2003. Systemic neutrophil activation in acute preschool viral wheeze. *Arch Dis Child* 88: 529-531
- Orr Y, Taylor JM, Cartland S, Bannon PG, Geczy C e Kritharides L. 2007. Conformational activation of CD11b without shedding of L-selectin on circulating human neutrophils. *J Leukoc Biol* 82: 1155-1125
- Panasiuk A, Wysocka J, Maciorkowska E, Panasiuk B, Prokopowicz D, Zak J e Radomski K. 2005. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 11: 7661-7665
- Philipson, M. e Kubes, P. 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine* 17: 1381-1390
- Rahman M. 2005. Introduction to Flow Cytometry. <http://static.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>
- Ramaiah, S.K. e Jaeschke, H. 2007. Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Acute Inflammatory Liver Injury. *Toxicologic Pathology* 35: 757-766
- Ramadori G, Moriconi F, Malik I e Dudas J. 2008. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol Suppl* 1: 107-117
- Reddy, JK. e Rao, MS. 2005. Lipid Metabolism and Liver Inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol* 290: 852-858
- Rybczynski M. 2010. Innate Immune Dysfunction In Sepsis And Acute-on-Chronic Liver Failure. Tese de Doutorado. Universidade de Medicina de Graz

Sadik CD, Kim ND, Luster AD. 2011. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* 32: 452-460

Sakaguchi, S., Takahashi, S., Sasaki, T., Kumagai, T. e Nagata, K. Progression of Alcoholic and Non-alcoholic Steatohepatitis: Common Metabolic Aspects of Innate Immune System and Oxidative Stress. 2011. *Drug Metab. Pharmacokinet* 26 :30-46

Sanz, M. e Kubes, P. 2012. Neutrophil-active chemokines in vivo imaging of neutrophil trafficking. *European Journal of immunology* 42: 278-283

Santos K. 2007. Análise Proteômica Comparativa entre Neutrófilos não ativados e Neutrófilos ativados com PMA, um análogo de diacilglicerol. Tese de Mestrado. Universidade de Brasília

Seki, E. e Schnabl. 2011. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis - Crosstalk between the liver and gut. *The Journal of Physiology* 590: 447-458

Smith JA. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56: 672-686

Srikrishna G, Freeze HH. 2009. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* : 11: 615-628

Stadlbauer V, Mookerjee RP, Wright GA, Davies NA, Jürgens G, Hallström S e Jalan R. 2008. Role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in mediating neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: 15-22

Stauffer JK, Scarzello AJ, Jiang Q, Wiltout RH. 2012. Chronic inflammation, immune escape and oncogenesis in the liver: A unique neighborhood for novel intersections. *Hepatology Accepted Article*

Stickel F e Seitz HK. 2010. Alcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24: 683-693

Taïeb J, Mathurin P, Elbim C, Cluzel P, Arce-Vicioso M, Bernard B, Opolon P, Gougerot-Pocidalo MA, Poynard T e Chollet-Martin S. 2000. Blood neutrophil functions and cytokine release in severe alcoholic hepatitis: effect of corticosteroids. *Journal of Hepatology* 32: 579-586

Tannapfel A, Denk, H, Dienes HP, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, Flott-Rahmel B. 2011. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Arch* 458: 511-523

Tilg H e Moschen AR. 2010. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52: 1836-1846

Tosi MF. 2005. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 116: 241-249

Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Francés R, Shah N, Mookerjee R, Such J e Jalan, R. 2011. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *Journal of Hepatology* 55: 574-581

- Tzur A, Moore JK, Jorgensen P, Shapiro HM e Kirschner MW. 2011. Optimizing optical flow cytometry for cell volume-based sorting and analysis. PLoS One 6:
- Valenti, L. e Fracanzani, A. 2009. The immunopathogenesis of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis: two triggers for one disease ?. Semin Immunopathol 31: 359-369
- Vidal S, Bellido-Casado J, Granel C, Crespo A, Plaza V e Juárez C. 2012. Flow cytometry analysis of leukocytes in induced sputum from asthmatic patients. Immunobiology 217: 692-697
- Voet D e Voet JG. 2004. BIOCHEMISTRY. 3ª ed. Pp 1065-1067. John Wiley & sons. Nova Jersey.
- Wakefield D e Kumar RK. 2001. Inflammation: Chronic. Encyclopedia of life Sciences. Nature Publishing Group. www.els.net
- Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J e Vasson MP. 2003. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. Clin Chim Acta 331: 103-110
- Yeh, MM e Brunt, EM. 2007. Pathology of fatty liver: differential diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. American Journal of clinical pathology 128: 837-847